



Università degli Studi di Genova

***Dipartimento di Scienze della terra, dell'ambiente e della vita
(DISTAV)***

Dottorato in: **SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE
E IL TERRITORIO (STAT)**

Curriculum: **SCIENZE DEL MARE
XXXI CICLO**

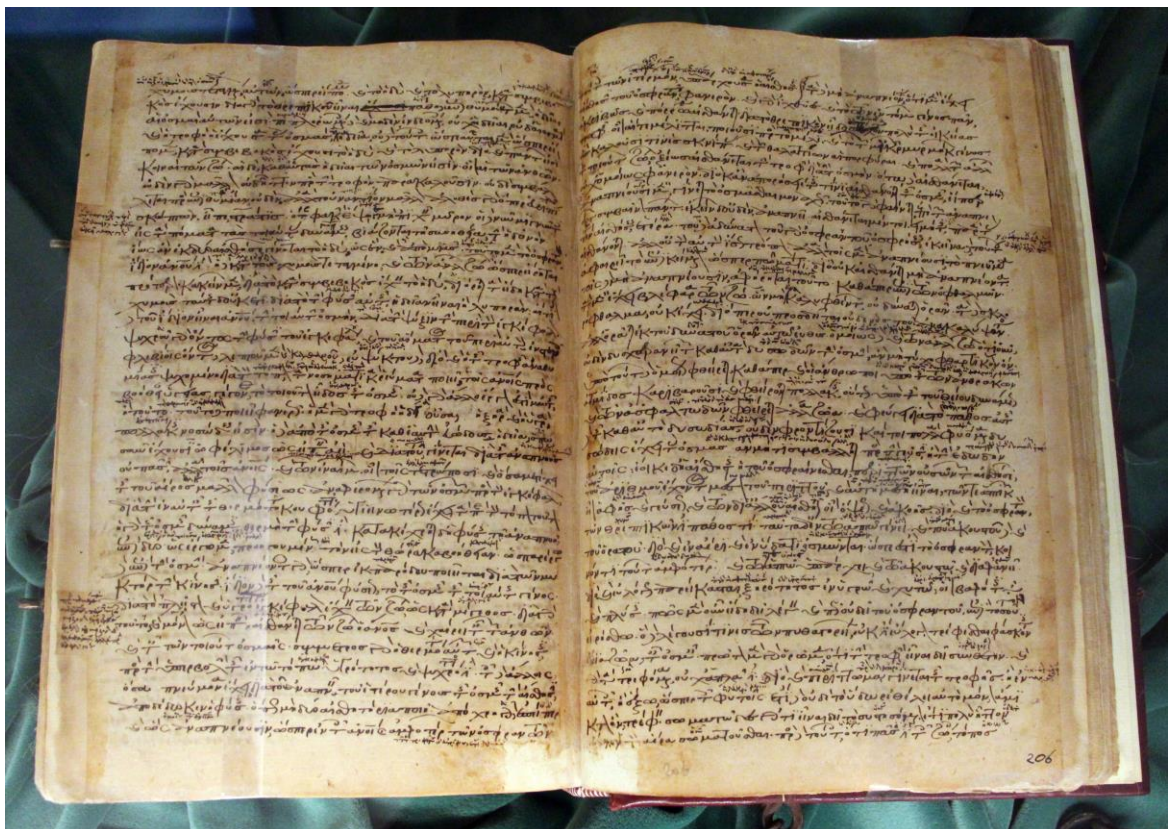
Dottorando: Dott. *Gallus Lorenzo*

Tutore: Prof.^{ssa} *Scarfì Sonia*

**Studio dei fattori di crescita coinvolti nello sviluppo
tissutale e nella deposizione di matrice extracellulare
del porifero *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847) con
metodi immunoistochimici e di biologia molecolare.**

“ [...] alcuni animali sono stazionari e alcuni sono erratici. Gli animali stazionari si trovano nell'acqua, ma nessuna di queste creature si trova sulla terraferma. Nell'acqua ci sono molte creature che vivono in stretta adesione ad un oggetto esterno, come nel caso di diversi tipi di ostriche. E, a proposito, la spugna sembra essere dotata di una certa sensibilità: come prova di ciò si riporta che la difficoltà nel distaccarla dai suoi ormeggi aumenta se il movimento per distaccarla non viene applicato di nascosto.” (Immagine 1) Aristotele, *Historia Animalium*.

The works of Aristotle, by Aristotle; Ross, W. D. (William David), 1877-; Smith, J. A. (John Alexander), 1863-1939. 1910-1931. Publisher Oxford : Clarendon Press
Contributions to Zoology, 76 (2) 103-120 (2007) Marine invertebrate diversity in Aristotle's zoology Eleni Voultsiadou, Dimitris Vafidis.



(Immagine 1) Costantinopoli, aristotele, historia animalium e altri scritti, xii sec., pluteo 87,4.JPG

<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode> <https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Saiklo>

“Nel 1847, (Giandomenico Nardo) lesse al nostro Istituto (Istituto Veneto di Scienze Lettere ed Arti, ndr), nell’adunanza del 23 marzo, un’altra Memoria (Immagine 2) intorno ad un prodotto marino da lui raccolto per la prima volta sulle coste dell’Istria fino dal 1823, e conosciuto dai pescatori sotto il nome di Carnume de mar o di Rognone di mare. Delle Chiaje lo aveva figurato e descritto come un polipo, cui aveva dato il nome d’*Imperata foraminosa* o *nodosa*. Il nostro collega, dopo un diligente esame microscopico e chimico, lo riconobbe come una vera spugna, distinta però da tutte le altre per caratteri molto importanti presentati dalla sostanza esterna, la quale invece di essere molle e gelatinosa come nelle altre, si mostrava di consistenza cartilaginea; e al nuovo genere, per essa stabilito, diede il nome di *Chondrosia*, e dal nome volgare, nonché dalla forma che più di frequente assume, denominò la specie *reniformis*.”

da: commemorazione di G. Nardo (1802-1877) tenuta da Giulio Pirona, (Istituto Veneto di Scienze Lettere ed Arti) Adunanza ordinaria 31 marzo 1878;

(Immagine 2) qui sotto: prima pagina della Memoria sopra il Rognone di mare letta dal Dott. Nardo all’Istituto Veneto di Scienze Lettere ed Arti, adunanza del 23 marzo 1847.

Si legge l’atto verbale della adunanza privata
21 febbraio, che è approvato.

Il M. E. dottor Nardo legge le seguenti :

*Osservazioni anatomiche sopra l’animale marino
detto volgarmente Rognone di mare.*

L’essere singolare, sul quale interesse la cortese vostra attenzione, è tra il novero di quelli, su cui natura sembra abbia voluto stendere più fitto il suo velo, per cimentare maggiormente la curiosità di coloro che più anelano penetrare nell’intimo de’ suoi secreti. Esso non è raro nel nostro Adriatico, e si conosce dai pescatori col nome di *Carnume de mar* o con quello di *Rognon de mar*, confondendosi con varie specie di *Ascidie composte*, colle quali ha rassomiglianza, ed in cui unione spesse volte si pesca.

INDICE

1. INTRODUZIONE	p 7
1.1 Le spugne, la loro collocazione evolutiva e la loro importanza ecologica.	p 7
1.1.2 Le spugne e la loro importanza nella <i>drug discovery</i> .	P 16
1.2 <i>Chondrosia reniformis</i> (Nardo 1847).	p 17
1.3 I fattori di crescita, le citochine.	p 22
1.4 Scopo della tesi.	p 31
1.5 Approccio sperimentale.	p 32
2. MATERIALI E METODI.	P 35
2.1 Approvvigionamento e mantenimento delle spugne.	p 35
2.2 Stabulazione dei fragmorph di <i>C. reniformis</i> .	p 40
2.3 Analisi del trascrittoma.	p 40
2.4 Condizioni di rigenerazione sperimentali.	p 41
2.5 Identificazione dei membri della superfamiglia TGF β (e TGF β r)	p 42
2.6 Osservazioni istologiche in microscopia luce.	p 45
2.7 Microscopia ESEM.	p 47
2.8 Microscopia elettronica a trasmissione TEM; colorazione di contrasto.	p 48
2.9 Identificazione delle cellule staminali della spugna.	p 48
2.10 Saggio di proliferazione cellulare.	p 50
2.11 Cinetica dei coanociti.	p 50
2.12 Analisi filogenetiche.	p 51
2.13 Ibridazione in situ (ISH).	p 53
2.14 Analisi dell'espressione genica qPCR.	p 56

2.15 Saggio tropo-collagene.	p 57
2.16 Effetto degli inibitori di BMP α e TGF β α .	p 57
2.17 Statistica.	p 59
3 RISULTATI	p60
3.1 Analisi del trascrittoma di <i>C. reniformis</i> .	p 60
3.1.1. Albero filogenetico.	p 60
3.2 Studio della rigenerazione dal punto di vista istologico.	p 64
3.2.1 Istologia normale di <i>Chondrosia reniformis</i> .	p 64
3.2.2 Osservazioni SEM della superficie in rigenerazione di <i>C. reniformis</i> .	p 67
3.2.3 Utilizzo del metodo Indian Ink per indagare il ruolo dei coanociti nella rigenerazione dei fragmorph in <i>C. reniformis</i> .	p 69
3.3 Studio della rigenerazione dal punto di vista molecolare.	P 69
3.3.1 Espressione basale dei TGF (1-6) e dei recettori TGFR (1, 2) identificati.	p 69
3.3.2 Espressione TGF (1-6) e TGFR durante il processo di rigenerazione.	p 71
3.3.3 Espressione di PIWI, Musashi e Bcl2, marcatori di staminalità / proliferazione, in <i>C. reniformis</i> in rigenerazione.	p 72
3.3.4 Espressione di collagene fibrillare, collagene non fibrillare, (prolil 4 idrossilasi), e sintesi di tropocollagene, in <i>C. reniformis</i> in rigenerazione.	p 73
3.3.5 Immunofluorescenze per Musashi in <i>C. reniformis</i> in rigenerazione.	p 73
3.3.6 Risultati della ISH.	p 74
3.3.7 Comparazione microscopica della rigenerazione in fragmorph normali e trattati con inibitori LDN-212854 e SB-431542.	p 75
3.3.8 Espressione di Musashi, Bcl2 e geni procollagenici in risposta	

all'inibitore LDN-212854.	p 78
4 DISCUSSIONE	p 79
5 CONCLUSIONI	p 88
5.1 Ultime considerazioni.	p 88
5.2 Schema riassuntivo finale.	p 89
6 BIBLIOGRAFIA	p 90
7 RINGRAZIAMENTI	p 97
8 FIGURE E TAVOLE	P 98
Dati Supplementari	P 131



(Immagine 3) *Chondrosia reniformis* nel suo ambiente naturale, in una immagine in cui si può apprezzare la livrea tipica degli esemplari che vivono in un ambiente illuminato. (*Chondrosia reniformis* Description La Vesse, Marseille, France. 20-07-2005. Author Picton, BernardJPG file - 180.81 kB - 1 024 x 768 pixels WoRMS taxa Creative Commons License This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial-Share Alike 4.0 License

<http://www.marinespecies.org/photogallery.php?album=714&pic=18309>).

1. INTRODUZIONE

Argomento della tesi di dottorato è lo studio, con metodi biomolecolari e istologici, dei fattori di crescita coinvolti nello sviluppo tissutale e nella deposizione di matrice extracellulare del porifero marino *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847) (Immagini 2 e 4).



(Immagine 4) *C. reniformis* fotografata in acquario

1.1 Le spugne, la loro collocazione evolutiva e la loro importanza ecologica.

I membri del phylum dei Porifera, (il cui nome deriva da *porus* e *ferre*, rispettivamente "poro" e "portare/portatore" in latino), sono gli animali comunemente chiamati spugne e considerati un clade basale dei Metazoa fratello del clade degli Eumetazoa (Diploblasti) (Pisani et al., 2015).

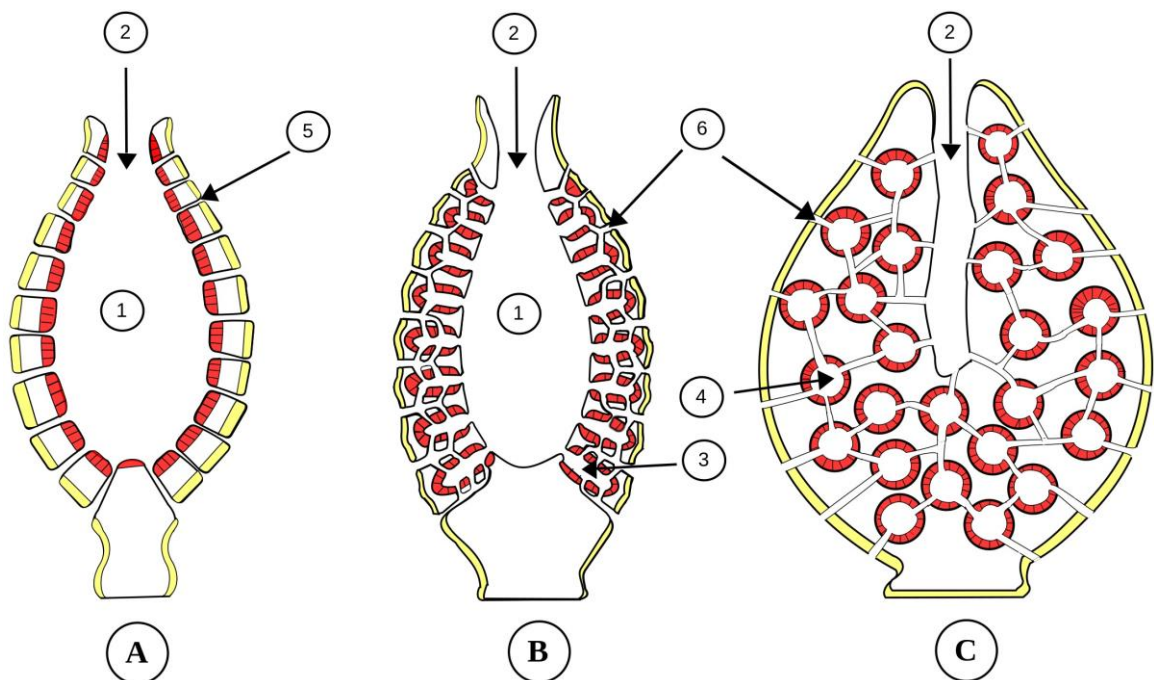
Le spugne sono organismi sessili, marini o di acque dolci, presentanti attiva alimentazione sospensivora. Possiedono cellule flagellate (coanociti), fagocitiche, con un collare di microvilli, che rivestono la superficie interna della camera chiamata

appunto coanocitaria. I coanociti generano, con il flagello, una corrente che fluisce dalla superficie inalante traforata da piccoli pori (*ostia*), per guidare l'acqua attraverso un sistema di canali nel loro corpo fino all'apertura esalante (*oscula*) (Gaino E, 2011) (Immagine 5). Sono in grado di filtrare grandi volumi di acqua in pochissimo tempo e nutrendosi sia di particelle sia di materiale disciolto in acqua occupano un posto di primo piano nell'ecologia in particolare marina. Esistono pochissime specie, quasi tutte di identificazione relativamente recente, che trascorrono la loro vita in ambienti marini, ad esempio profondi, privi di particelle di cibo in sospensione, che per nutrirsi predano piccoli animali, comportandosi da vere e proprie "spugne carnivore", e che costituiscono un'eccezione interessante dal punto di vista zoologico, ad esempio la "spugna lira", *Chondrocladia lyra* (Lee et al., 2012; Vacelet, J. e Boury-Esnault, N., 1995). Da un punto di vista strutturale le spugne sono organismi considerati dotati di un modello corporeo "modulare", possiedono infatti più unità ripetute, i "moduli acquiferi", che sono definiti come delle "associazioni di tessuto accomunati da gruppi di canali e di camere coanocitarie che fanno capo ad un unico osculo esalante" (Alexander et al., 2015). Da questo punto di vista il corpo di una singola spugna, dotata di diversi canali, potrebbe essere considerato come una "colonia" di diversi organismi. E' importante osservare che, come conseguenza del loro essere organismi peculiari ed evolutivamente basali, le spugne mancano di una qualunque simmetria corporea, di organi definibili tali e persino di veri tessuti, salvo l'importante eccezione della recentemente costituita quarta classe dei Porifera, la classe delle Homoscleromorfa

della quale tratteremo in seguito, mentre, al contrario, possono possedere uno scheletro interno di spongina e/o di spicole di carbonato di calcio o biossido di silicio. Questo carattere è importante nella sistematica dei poriferi e permette di suddividere le spugne nelle tre classi classiche, le **lalospongiae** (o Hexactinellida) con spicole di silicati che presentano fino a sei raggi, le **Calcarea** con uno scheletro di carbonato di calcio, alcune presentanti anche un massiccio scheletro esterno di aragonite, e infine le **Demospongiae** caratterizzate dalla presenza di spicole di silicati e/o fibre di spongina, anch'esse con alcune specie che mostrano uno scheletro esterno in aragonite come in Calcarea. Come abbiamo accennato prima, recenti ricerche hanno suggerito che le **Homoscleromorpha**, un gruppo precedentemente ascritto alle Demospongiae, sono da considerarsi a tutti gli effetti una quarta classe (Gazave et al., 2012), dato che negli appartenenti a questo gruppo è stata dimostrata la presenza di una membrana basale discreta ben riconoscibile, con vere giunzioni cellulari, e che quindi le Homoscleromorpha sono in possesso di veri tessuti, un vero epitelio, un carattere unico tra le spugne e indice di un maggior grado di evoluzione. Tra le Homoscleromorpha è risultata essere di particolare interesse la specie *Oscarella lobularis*.

Diverse ricerche avevano già cercato di fare luce sui rapporti esistenti tra le tre classi classiche di spugne, Calcarea, Demospongie ed Hexactinellida, tentando di definire se il gruppo è monofilico o parafiletico nei poriferi. Borchellini et al., (2001) attraverso l'analisi dell'rRNA 18S, hanno suggerito che le spugne siano parafiletiche, con le Calcarea più correlate agli Eumetazoa piuttosto che alle spugne silicee, ma tutti i

dati antecedenti alla creazione della Classe delle Homoscleromorpha dovranno essere riconsiderati, almeno in chiave evolutiva. Le spugne vengono anche divise in tre gruppi in base alla crescente complessità della loro struttura interna (Immagine 5).



(Immagine 5) Di Ewan ar Born - Inspiré des graphiques, et up-loadé sous licence Domaine public par cs:Karakal et de descriptions diverses., CC BY-SA 4.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3657169>

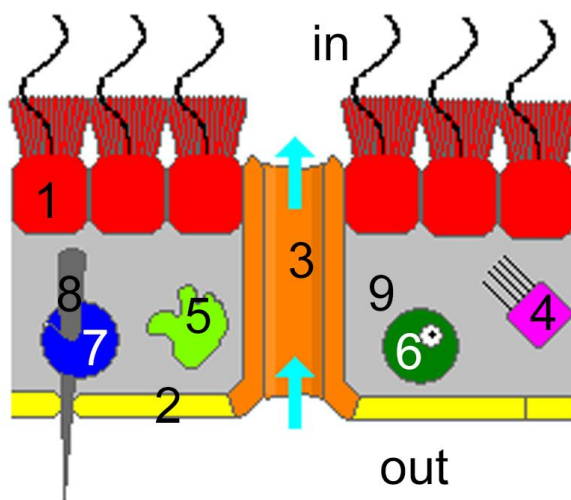
Legenda. A. tipo Ascon B. tipo Sycon C. tipo Leucon; 1 spongocele; 2 osculo; 3 apopili; 4 camere coanocitarie; 5 pori; 6 canali inalanti.

Una spugna **Ascon** (dal greco askós, sacco) possiede un'unica grande cavità interna, chiamata spongocele, rivestita da coanociti e collegata da pori attraverso le pareti del corpo e aperta in uscita da un oscolo. Questa caratteristica le costringe a non superare una certa dimensione, dato che un aumento del volume non vedrebbe un corrispondente aumento della superficie filtrante. Si annoverano tra le spugne calcaree più semplici.

Le spugne riescono ad aumentare le loro dimensioni grazie alla struttura di tipo **Sycon**, (dal greco sykon, spugna) dove si ha un considerevole aumento della superficie filtrante per la presenza di invaginazioni della parete del coanoderma. A grandi linee si può affermare che questa sia la struttura delle spugne calcaree e silicee più complesse.

Da un punto di vista strutturale però l'evoluzione dei poriferi raggiunge il suo punto di massima evoluzione con l'organizzazione di tipo **Leucon** (dal greco leukós bianco) in cui non si può più considerare la presenza di uno spongocele ma le invaginazioni del coanoderma si chiudono in numerosissime camere flagellate, le camere coanocitarie appunto, collegate da reti complesse di canali apportanti acqua dai pori presenti sulla superficie dell'animale e che confluiscono tra di loro drenando infine l'acqua all'esterno. Tutti i canali di una certa regione confluiscono in un unico canale che permette la fuoriuscita dell'acqua dall'osculo. Con quest'organizzazione la superficie filtrante è così in grado di adeguarsi all'aumento di volume dell'organismo. Le diverse specie di spugne vivono complessivamente dalla zona di marea alle profondità oceaniche, così come in grotta. Le loro forme e dimensioni sono molto variabili e tendono a ottimizzare il processo di filtrazione dell'acqua in diverse condizioni ambientali. Le **larve** di spugne nuotano liberamente e sono in grado di insediarsi scegliendo attivamente il sito di insediamento. Oltre alla riproduzione sessuale, le spugne mostrano il fenomeno della rigenerazione da **frammenti** o da **gemme**, inoltre, in condizioni ambientali avverse, alcune specie producono gemmule, strutture di resistenza che riprenderanno l'attività con il

miglioramento delle condizioni ambientali. Anatomicamente in una spugna è generalmente possibile considerare la presenza di diversi strati, dall'esterno all'interno (Gaino, 2011). Un primo strato è l'**esopinacoderma**, anche detto pinacoderma, o ectosoma, considerando le cellule presenti nella regione, costituito essenzialmente da **esopinacociti** (o pinacociti), cellule con funzione prevalente di rivestimento (Immagine 6).



(Immagine 6) Di Philcha - Opera propria, Pubblico dominio
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5098571>

Legenda: 1 coanociti; 2 esopinacociti; 3 porociti; 4 lofociti che rilascia collagene; 5 archeociti; 6 oocita; 7 sclerocita; 8 spicola; 9 matrice del mesoilo.

Si considerano i **porociti**, esopinacociti specializzati, a forma di tubo, che rivestono il poro presente sulla superficie della spugna, gli **endopinacociti** che rivestono i canali interni della spugna, distinguendosi dai primi proprio in funzione della loro posizione, e un'ulteriore suddivisione è quella in **prosopinacociti** rivestenti i canali inalanti e **apopinacociti** rivestenti quelli esalanti. Gli endopinacociti sono flagellati nelle Homoscleromorpha conosciute, così come in alcune Demospongiae (Ereskovsky, 2009).

Un secondo strato è il **mesoilo**, essenzialmente una matrice cellularizzata e che si va a collocare topologicamente nello spazio tra l'**esopinacoderma** più esterno e il terzo strato, il **coanoderma**, più interno, le cui dimensioni possono variare notevolmente da spugna a spugna. Tra i principali tipi di cellule presenti nel mesoilo consideriamo i **collenciti**, cellule in grado di produrre un tipo di spongina, dalla forma variabile, spesso adese alle fibre presenti nella spugna e i **lofociti**, (dal greco *lóphos*, ciuffo) una variante del collencita. I lofociti sono ameboidi e secernenti fibrille di collagene dal polo posteriore, mentre quello anteriore è caratterizzato dalla presenza di pseudopodi. Non sono presenti in tutte le spugne ma solo in alcune specie, ad esempio della classe delle Calcarea, e sono tipiche della spugna *Chondrosia reniformis* (Gaino, 2011).

Come già ricordato nella maggior parte delle spugne è presente una struttura scheletrica, formata da spicole silicee o calcaree, oppure da fibre di spongina, quindi proteiche, e da un punto di vista cellulare le prime sono prodotte da **sclerociti**, le seconde da **spongociti**. Nei poriferi, ma non in tutti, è inoltre presente un ulteriore tipo cellulare, gli **archeociti**, unanimemente riconosciuti per essere vere cellule staminali pluripotenti e quindi in grado di dare origine a tutti gli altri tipi di cellule, fra i quali i gameti.

Il coanoderma è a sua volta la massa costituita prevalentemente dalle camere coanocitarie e dalla rete di canali che a loro afferisce.

E' poi possibile considerare la regione di contatto con il substrato come la **zona basale**, comprendente nelle diverse specie di spugna peculiarità legate alle modalità

di adesione, alle caratteristiche morfologiche e alle caratteristiche del substrato di adesione.

Le spugne marine contengono regolarmente varie comunità microbiche, batteri, archaea, microalghe e anche funghi, di grande complessità e che costituiscono tutt'ora un aspetto ancora poco conosciuto nonostante tutti i lavori che in particolare nell'ultimo decennio sono stati effettuati in particolare grazie alla metagenomica. Queste comunità microbiche sono state stimate in grado di costituire fino al 40% del volume della spugna e contribuire considerevolmente al metabolismo del porifero ospite (Beate et al., 2017; Taylor et al., 2007).

Le spugne presentano ovviamente una grande **capacità di rigenerazione**, possono rigenerare interi organismi da frammenti, addirittura da cellule dissociate, come si è osservato oramai da più di un secolo eppure, nonostante i tanti diversi studi posti in essere in passato e in particolare negli ultimi due decenni, solo adesso si stanno iniziando a chiarire i meccanismi molecolari che regolano questi processi.

I poriferi risultano sempre più dotati di una regolazione della differenziazione/rigenerazione delle cellule con funzioni staminali molto fine, se si considera il grado di primitività del gruppo, e il campo da esplorare è molto vasto proprio considerando la grande differenziazione all'interno delle quattro classi e all'antichità di questi organismi, i cui attuali membri hanno quindi alle spalle (!) una lunga storia evolutiva (Funayama, 2008).

Un tipo cellulare ovviamente importante in questo ambito, anche se non presente in tutti i poriferi, sono proprio gli archeociti, vere staminali pluripotenti che possono originare anche i coanociti.

Ma proprio i coanociti possono a loro volta divenire archeociti e quando necessario gameti, esibendo quindi chiare caratteristiche di staminalità (Ereskovsky et al., 2015). Dato che gli archeociti e i coanociti sono tipi cellulari fondamentali dei primi metazoi, un aumento delle conoscenze sulla biologia che regola la loro staminalità potrà supportare le ricerche volte a chiarire i meccanismi che stanno alla base della differenziazione e dell'auto-rinnovamento delle cellule staminali.

Alla luce delle attuali conoscenze sull'evoluzione delle spugne e considerando che le Haploscleromorpha sono ad oggi indicate quali le più moderne fra i poriferi proprio per via della comparsa di un vero tessuto, considerabile tale per la presenza di una membrana basale e di giunzioni cellulari, il confronto fra i meccanismi di rigenerazione di queste ultime e quelli delle Demospongie potrà aiutare a chiarire i meccanismi che hanno portato a definire il passaggio da organismi senza veri tessuti agli eumetazoi.

[1.1.2 Le spugne e la loro importanza nella drug discovery.](#)

Per Drug Discovery, in medicina e farmacologia prima e nelle biotecnologie poi, si intende il processo attraverso il quale vengono scoperte molecole candidate a fungere da nuovi farmaci. Storicamente, i farmaci sono stati scoperti identificando il principio attivo presente nei rimedi tradizionali o altrimenti per scoperta fortuita.

Le spugne marine sono state considerate tesoro sommerso (!) di sostanze chimiche di interesse farmacologico con un grande potenziale relativo ai loro metaboliti secondari, e proprio questi sono stati oggetto di studi condotti per esaminarne le proprietà farmacologiche (Fusetani e Matsunaga, 1993). I diversi composti fino ad oggi identificati hanno dimostrato proprietà antivirali, antibatteriche, antimicotiche, antitumorali e immunosoppressive, per citare le loro proprietà di maggiore interesse (Anjum et al., 2016). La grandissima variabilità nella struttura di questi composti possono aumentare le possibilità di produrre farmaci mirati per le diverse patologie.

Uno dei prodotti farmaceutici più esemplificativi è l'Aciclovir (acicloguanosina) un analogo aciclico della guanosina utilizzato come antivirale. Proprio dei nucleosidi, isolati da *Cryptotethya cripta* (de Laubenfels, 1949), sinonimo *Tectitethya crypta*, una demospongia caraibica appartenente alla famiglia Tethyidae, e denominati spongotimidina e la spongouridina, sono stati la base per la successiva sintesi chimica dell'Aciclovir. Si tratta di uno degli antivirali più usati, e che ha il suo massimo utilizzo nel trattamento delle infezioni causate da *Herpes simplex* virus, da *Varicella zoster* e da *Herpes zoster*. Mostra uno spettro limitato, elevata selettività e scarsi effetti collaterali, tutti fattori che ne hanno determinato il successo anche commerciale oltre che terapeutico (Morfin e Thouvenot D, 2003).

Questo era solo uno dei possibili esempi, ma già da queste brevissime considerazioni su di un campo estremamente vasto, si può comprendere come in generale ci sia

interesse a sviluppare i metodi di allevamento delle spugne, mantenendo una buona resa nel tempo.

1.2 *Chondrosia reniformis* (Nardo 1847).

Chondrosia reniformis, chiamata comunemente “rognone di mare”, è una Demospongia mediterranea da bassi fondali rocciosi, (Classe Demospongiae, Ordine Chondrosida, Famiglia Chondrillidae) ed è caratterizzata da una serie di peculiarità biologiche che la rendono interessante da diversi punti di vista e oggetto di indagine da svariati decenni (Immagine 3 e 4). Il primo autore che descrisse questo organismo come una vera spugna, e le attribuì il nome attualmente accettato, fu nel 1847 **Giandomenico Nardo**, medico naturalista e membro dell’Istituto Veneto di Scienze Lettere ed Arti. Possiede una tipica forma globosa reniforme, con una consistenza cartilaginea se manipolata, e la sua superficie è liscia al tatto e lucida. La sua livrea passa da diverse tonalità di grigio al marrone, fino a sbiancare completamente se l’animale si è sviluppato in ambiente non illuminato, in grotta o semplicemente in ombra permanente. Come è tipico in molte Demospongiae, è in rapporto simbiotico con batteri e cianobatteri fotosintetici, che sono presenti nei tessuti superficiali della spugna e le cui concentrazioni variano notevolmente in funzione delle condizioni di luminosità ambientali, fino a scomparire del tutto e da cui discende la principale causa di variazione di colore. Occorre ricordare, come già scritto, che mediamente il 40% della massa delle Demospongiae è dovuto proprio alla componente batterica, che acquisisce una grande importanza nella loro biologia. Anatomicamente C.

reniformis possiede una struttura Leucon con due regioni distinte: l'*ectosoma* o corticale, esterna, un mesoilo molto sviluppato e ben evidenziato, e una più interna, il *coanosoma*. Il coanosoma, che costituisce la porzione attivamente filtrante della spugna, presenta numerose camere coanocitarie, rivestite dai coanociti, e il complesso sistema di canali che le collegano con l'esterno (Gaino, 2011). Il mesoilo è caratterizzato dalla presenza di fasci di collagene compatto con una componente cellulare dispersa mobile nella quale spiccano per numerosità i lofociti, sintetizzanti il collagene, di piccole dimensioni, e grandi **cellule sferulose** dalla funzione non ancora risolta. L'*ectosoma*, che lo riveste, è delimitato verso l'esterno da uno strato di cellule appiattite, gli esopinacociti, arricchito da altri elementi cellulari in particolare numerose cellule sferulose, e lofociti, poste sopra ai densi fasci intrecciati di fibrille di collagene del mesoilo. *C. reniformis* non possiede le spicole opaline caratteristiche delle altre demosponge ma l'*ectosoma* e il mesoilo ha il collagene rinforzato dalla presenza di granelli di sabbia silicea e da spicole esogene che sono inglobati attivamente (Cerrano et al., 2007; Bavestrello et al., 1995, 1998). Questa caratteristica assenza di spicole proprie della spugna, che non è in grado di produrle, e la costante presenza di materiale esogeno sia di origine biologica, come appunto le spicole di altre spugne e in particolare granelli di piccole dimensioni di natura silicea, prevalentemente cristallini, selezionati tra il materiale di diversa natura con il quale la spugna viene in contatto, ha attirato l'attenzione dei ricercatori da tempo. E' stato poi dimostrato che questi granelli vengono aggrediti chimicamente dalla spugna attraverso l'intervento della componente cellulare e

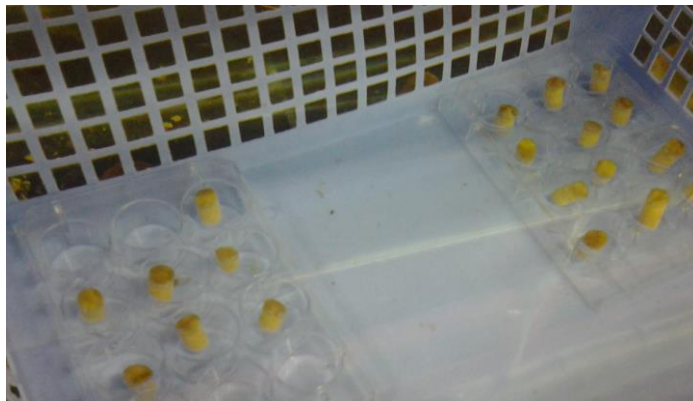
dissolti attivamente, e che gli ioni di Si liberati stimolano la sintesi di collagene (Pozzolini et al., 2015, 2016a,b; Giovine et al., 2002, 2013). Gli esopinacociti possono mancare, specialmente nelle porzioni basali della spugna, e il collagene si ritrova a contatto con l'acqua (Garrone et al., 1975), mostrando come sia in grado, indipendentemente dalla componente cellulare di isolare adeguatamente la massa della spugna dall'ambiente esterno. La componente collagenica diminuisce notevolmente nel coanosoma e a differenza di altre Demospongiae quali *Chondrilla nucula*, risulta particolarmente spessa proprio nel mesoilo dove costituisce masse notevoli. Da un lato questo permette a chi si occupa dello studio del collagene prodotto dai poriferi di avere a disposizione porzioni dell'organismo dalle quali prelevare masse consistenti e impacchettate di collagene con le quali lavorare, e dall'altro ha suggerito come proprio *C. reniformis* possa rappresentare una valida fonte di collagene di origine marina economicamente sfruttabile. Questo spiega la mole di studi sull'argomento presenti in letteratura. Infatti *C. reniformis* riveste un potenziale ruolo biotecnologico di rilievo, ed è nota sia per produrre molecole di interesse farmacologico di tipo antimicrobico (Thomas et al., 2010) sia per il collagene estratto per svariati impieghi cosmetici o biomedicali (Swatschek et al., 2002; Nicklas et al., 2009a,b; Giovine et al., 2013, Pozzolini et al. 2016, 2017; 2018a,b). Sempre in *C. reniformis* è stato poi possibile identificare e clonare una proteina omologa al **fattore di necrosi tumorale**, o tumor necrosis factor (TNF), quindi TNF-like o chTNF, che è perciò il primo esempio di TNF messo in evidenza nel gruppo animale più antico. Insieme è stato identificato un recettore putativo per il

TNF, dimostrando come già nei poriferi sia presente e funzionante il sistema TNF-TNFr. E' stato inoltre dimostrato il coinvolgimento del chTNF sia nella risposta alla presenza di batteri Gram+ esogeni, sia nella deposizione di collagene nell'animale in vivo (Pozzolini et al., 2016b). L'acquacoltura di spugne è attualmente molto perseguita per ottimizzare la produzione dei suddetti composti d'interesse biologico. Lo sviluppo di colture in grado di mantenere il più possibile inalterata l'anatomia e l'istologia delle spugne viene da almeno una decina di anni considerata una via promettente per l'utilizzo biotecnologico delle spugne. Nickel e Brümmer nel 2003 hanno messo a punto un metodo per l'utilizzo di frammenti di *C. reniformis* in coltivazioni in vitro denominati **fragmorph**. Si tratta essenzialmente di carotaggi della massa della spugna effettuati perpendicolarmente alla faccia superiore in modo tale da ottenere dei **cilindretti**, i fragmorph appunto, dove le superfici superiore ed inferiore risultano intatte mentre lateralmente viene esposta la massa interna del mesoilo e del coanosoma (Immagine 7, 8 e 9). La messa a punto del protocollo per la produzione di fragmorph da parte di Nickel e Brümmer (2003) ha permesso di stabilire che il processo di rigenerazione di frammenti di 50-80 mm³, considerate dimensioni ottimali, che dopo aver impiegato alcune settimane a ricostituire lo strato esterno in periodi variabili circa due mesi genera dei corpi tondeggianti o ovoidali nei quali il sistema acquifero si presenta in forma ridotta. Le cellule della spugna venivano considerate dai due autori in attiva proliferazione solo durante le prime settimane di coltura e anche mantenendo i fragmorph in coltura per periodi di alcuni mesi non è gli è stato possibile dimostrare ulteriore

proliferazione cellulare, mentre è stata messa bene in evidenza l'incorporazione di silicati. L'utilizzo dei fragmorph di *C. reniformis* è stato perciò proposto come modello per studiare la biologia delle spugne considerando i diversi fragmorph ottenuti da una stessa massa di spugna alla stregua di cloni aventi le stesse caratteristiche. Ciò potrebbe permettere di sviluppare il potenziale biotecnologico di *C. reniformis* tramite lo studio di queste colture in vitro di frammenti di spugna (Pozzolini et al. 2016, 2017; 2018 a,b).



(Immagine 7 e 8) Esemplare di *C reniformis* prima e dopo il carotaggio.



(Immagine 9) Esempio di batteria di fragmorph in acquario.

In base all'anatomia della spugna di partenza si effettuano i carotaggi e mantenendo le spugne e i fragmorph sempre immersi li si dispone in well plate *ad hoc* negli

acquari sperimentali mantenendo la polarità alto basso originaria della spugna e tutti i parametri costanti, ad esempio temperatura, ciclo diurno, salinità.

Ogni esperimento deve essere eseguito con un set di espianti derivanti dalla stessa spugna, così le dimensioni dell'esemplare e la sua forma divengono fattori critici.

1.3 I fattori di crescita, le citochine.

Esiste una certa confusione nell'utilizzo dei termini fattori di crescita, citochine e ormoni, per i non specialisti (Alberts, Johnson, Lewis, 2016). I fattori di crescita, o più comunemente **growth factor** (GF), usando la forma anglosassone, sono le proteine con la capacità di stimolare proliferazione e differenziamento cellulare. La storia dello studio dei fattori di crescita inizia più di mezzo secolo fa, nel 1952, anno in cui Stanley Cohen e Rita Levi-Montalcini, scoprirono il **nervous growth factor** (NGF) (fattore di crescita nervosa), il primo growth factor (GF) (fattore di crescita) identificato. I due ricercatori avevano osservato che il trapianto di una gemma di arto di embrione di pollo induceva la crescita di nuove fibre nervose alla periferia dell'arto trapiantato. Successivamente si osservò che l'innesto di un sarcoma (S180) sulla parete del corpo di un embrione di pollo determinava la penetrazione di fibre nervose all'interno del sarcoma stesso. Proprio in un estratto del sarcoma venne isolato il NGF, che essendo sensibile alle proteasi e insensibile alle nucleasi, venne riconosciuto essere una proteina. Da un veleno di serpente, nel 1959, è stato isolato un secondo NGF (Hamburger, 1962), dalle ghiandole salivari del topo è stato poi isolato l'**epidermal growth factor** (EGF) (fattore di crescita epidermico) (Navis,

2007). La possibile esistenza dell'EGF era stata osservata nei topi neonati iniettati con estratti non purificati dalla ghiandola salivare del topo, che all'epoca era un'importante fonte di NGF, nei quali si verificava l'eruzione precoce dei denti e l'apertura della rima palpebrale (Fiore et al. 2009). Questi effetti "collaterali" però si perdevano nei topi iniettati con il NGF purificato indicando a Cohen l'esistenza di un GF di tipo epidermico nell'altra frazione dell'estratto della ghiandola salivare. L'EGF accelera la crescita nei tessuti epidermici, interviene anche nello sviluppo embrionale, nel sistema nervoso, in tumori epidermici ed è evolutivamente ben conservato. Da quel momento sono stati continuamente isolati sempre più nuovi NGF. La scoperta dei NGF ha aperto una vastissima nuova area di indagine della biologia cellulare e Stanley Cohen e Rita Levi-Montalcini vennero insigniti del Premio Nobel nel 1986 (Aloe, 2004). Anche la storia dello studio delle citochine ha oramai più di mezzo secolo ed il suo inizio è praticamente coevo a quello dello studio dei GF. Venne identificato inizialmente l'**interferon alpha** (IFN- α) (l'interferone alfa), nel 1957 appunto, grazie alla sua attività di interferenza della replicazione virale. Nuovamente si trattava di una proteina, e la sua identificazione fu seguita a distanza di una decina di anni dalla scoperta dell'**interferon gamma** (IFN- γ), (l'interferone-gamma) a partire da linfociti. Fu poi il turno del **macrophage migration inhibitory factor** (MIF) (fattore di inibizione della migrazione macrofagica e leucocitaria) nel 1966 e poco dopo venne coniato il termine **linfokines** (linfocine) per designare le proteine originate dai linfociti e **monokines** (monochine) per quelle derivate da macrofagi e monociti. L'apparente confusione rientrò quando nel 1974 venne

dimostrata la produzione di MIF da parte di cellule non appartenenti al sistema immunitario, portando all'adozione del termine **cytokines**, (citochine). Sempre alle citochine si possono ascrivere le **interleuchine**, proteine secrete da cellule immunitarie quali linfociti, fagociti, cellule natural killer (NK), dendritiche, e anche endoteliali ed epiteliali. (Occorre sottolineare come il termine interleuchina derivi dalla città svizzera di Interlaken, dove venne coniato, e non riguardi i leucociti) (Alberts, Johnson, Lewis, 2016). Ancora ascrivibili alle citochine ma che occorre considerare come una vasta classe di proteine caratterizzata da una omologia strutturale, vi sono le **chemochine**, proteine a basso peso molecolare (circa 10 kD) e che inizialmente furono considerate proprio interleuchine. Se ne conoscono all'incirca 50. Le cellule che secernono chemochine, fibroblasti, leucociti, cellule endoteliali ed epiteliali, lo fanno in caso di infezione/inflammatione ma anche costitutivamente. I loro recettori sono tipiche G-Protein Coupled Receptors (GPCR), con sito di legame extracellulare, le 7 α -eliche transmembrana e una G-protein citoplasmatica.

Un'altra importante citochina è il **tumor necrosis factor** TNF (fattore di necrosi tumorale) che venne isolato dopo l'osservazione sperimentale per cui un trapianto di un sarcoma aveva fatto rilasciare un fattore solubile da parte dell'ospite che aveva causato la necrosi del sarcoma stesso. A partire dalla metà degli anni ottanta del secolo scorso il TNF venne considerato parte di un gruppo di citochine indicato come la **TNF family** (Locksley et., 2007). Alle citochine si ascrive anche la famiglia delle

ematopoietine, tra cui spicca l'eritropoietina (Epo), che regola la produzione di globuli rossi (eritropoiesi) ed è prodotta a livello renale.

Rimane ancora da considerare tra le citochine un membro importante, il **transforming growth factor beta** (TGF- β) (fattore di crescita trasformante beta) una proteina secreta (Herpin et al., 2004). Si conoscono ad oggi tre isoforme, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Solitamente il TGF- β 1, primo di tutta la famiglia di proteine a essere stato caratterizzato, è indicato genericamente come TGF- β . La famiglia delle TGF- β è in realtà assai vasta e differenziata, annovera tra le varie proteine le **attivine**, le **inibine**, l'**ormone anti-mulleriano**, e le **bone morphogenetic proteins** (BMP) (Burt and Law, 2004).

Si parla proprio di una **transforming growth factor beta Superfamily** (TGF- β SF) i cui membri controllano, tra l'altro, proliferazione e il differenziamento in un grande numero di tipi cellulari. Alle BMP sono attribuiti ruoli nella funzione riproduttiva, nella motilità e adesione cellulare, nella morfogenesi dell'osso (da cui il nome del gruppo di citochine) e anche nei processi di cicatrizzazione delle ferite. Non hanno solo un ruolo di induzione alla crescita ma anche, in diversi casi studiati, di inibizione della crescita, ad esempio in alcuni tipi cellulari del tessuto epiteliale o endoteliale e possono essere implicate in una segnalazione di tipo autocrino, quando una cellula esprime TGF- β possiede anche i recettori TGF- β r. All'interno della TGF β Superfamily le TGF β agiscono in particolare su proliferazione, differenziamento e motilità, adesione, cicatrizzazione e osteomorfogenesi, via TGF β r. Le BMP, via BMPRs, fosforilano a livello citoplasmatico i fattori di trascrizione **small mother**

against decapentaplegic (Smads) coinvolti in osteo- e condrogenesi e inibizione della proliferazione. La fosforilazione delle Smads implica la loro dimerizzazione e traslocazione nel nucleo dove attivano o reprimono la trascrizione come fattori di trascrizione, regolando in questo modo l'espressione dei geni target (Alberts, Johnson, Lewis, 2016).

Recentemente le BMP sono state oggetto di una esaustiva review (Scarfi, 2016). Le BMP associate alla matrice extracellulare partecipano al controllo di attività biologiche quali lo sviluppo di reni e arti, l'angiogenesi, la fibrosi tissutale, lo sviluppo dei tumori (Scarfi, 2016; Ducy et Karsenty). Le BMP sono upregolate nell'epitelio degli abbozzi degli arti dei mammiferi dove controllano proliferazione e differenziazione dei progenitori mesodermici (Sakou, 1998), perciò una interferenza nel pathway di segnalazione delle BMP può determinare importanti conseguenze sullo sviluppo. Gli esempi in letteratura scientifica sono oramai molteplici: i topi nulli per BMP2 e 4 presentano mortalità prenatale, mentre diverse mutazioni di BMP sono associate a polidattilia (BMP4 e 7), "orecchio corto" (BMP5), costole anomale (BMP7), accorciamento delle ossa lunghe (BMP6), condrodisplasie (BMP14), fusioni ossee (BMP13), fratture spontanee (BMP2 e 5) e osteogenesi imperfetta (BMP1) (Sakou, 1998; Scarfi, 2016; Ducy et Karsenty, 1998). Le BMP intervengono nello sviluppo del sistema nervoso centrale e determinano anomalie di varia natura in diversi organi, dimostrando come la morfogenesi a livello dell'intero organismo sia influenzata dalla loro attività, guadagnandosi per questo l'appellativo di proteine morfogenetiche del corpo (Wagner, 2010).

Le BMP possono upregolare altri fattori di crescita come il **fattore di crescita derivato dalle piastrine** (PDGF), il **fattore di crescita endoteliale vascolare** (VEGF) e il **fattore di crescita insulino-simile 1** (IGF1). L'espressione delle BMP è indotta nel reclutamento delle cellule staminali mesenchimali (MSC), in midollo osseo, tessuto adiposo e periostio, ed è sostenuta fino alla formazione dell'osso (Pittenger et al., 1999; Scarfi, 2014; Krampera et al., 2006) quindi le BMP agiscono inducendo e promuovendo condrogenesi e osteogenesi (Pizette e Niswander, 2000).

I 20 membri attualmente noti delle BMP (Weiskirchen e Meurer, 2013) sono arrangiati in sottofamiglie spesso ridondanti: BMP canoniche (BMP1-5), proteine osteogeniche (OP1-3 alias BMP7-8-8b), fattori di differenziazione della crescita (GDF1, GDF2/BMP9, GDF3, GDF5/BMP14, GDF6/BMP13, GDF7/BMP12, GDF8-10, GDF9, GDF10 e GDF11/BMP11) e proteine morfogenetiche derivate dalla cartilagine (alias CDMP1-2, BMP14-13, rispettivamente) (Chang et al., 1994). Le BMP sono sintetizzate come **precursori inattivi con un peptide segnale N-terminale**, un **prodotto che controlla il folding** e un **polipeptide maturo C-terminale** (Xiao et al., 2007). Secrete, le BMP agiscono soprattutto come omodimeri e interagiscono con antagonisti omodimerici (ad es: gremlin e noggin) (Bragdon et al., 2011). Attualmente sono conosciuti due tipi di **recettori serina/treonina-chinasi** per le BMP: tipo I, BMPR-I e tipo II, BMPR-II. I loro ligandi trasducono il segnale mediante complessi eteromerici con questi 2 differenti tipi di recettori serina/treonina chinasi: i recettori tipo I di circa 50-55kD e recettori tipo II di circa 70-80kD. I ligando sono in grado di legarsi ai recettori di tipo II anche senza la presenza dei recettori di tipo I,

ma mentre i recettori di tipo II necessitano, per l'attivazione, dei recettori di tipo I, viceversa i recettori di tipo I richiedono la presenza del recettore tipo II per legarsi al ligando. (Entrez Gene: BMPR1A, 2019). I recettori serina/treonina chinasi sono perciò proteine in possesso di un dominio citosolico in grado di autofosforilarsi agendo su alcuni residui di, appunto, serina o di treonina, ma che allo stesso tempo sono anche in grado di fosforilare gli stessi amminoacidi presenti nella struttura di altre proteine a loro associate. Nello specifico, legato a BMPR-I, il complesso ligando/recettore recluta BMPR-II, che a sua volta fosforila il BMPR-I sul suo dominio citoplasmatico ricco di glicina/serina (GS), successivamente il segnale BMP viene trasdotto ai geni target attraverso un percorso Smad-dipendente/indipendente.

Gli Smad si dividono per funzioni e attivatori. Smad1/5/8 (R-Smads) sono attivati via BMPR-I. Gli R-Smads fosforilati (R-SmadsP) formano un eterodimero DNA-binding con Smad4 (Shi et al., 2007) via mediatori extra/intracellulari. Segnali intracellulari che inibiscono Smad6/7 interferiscono con il legame del mediatore di Smad4 e la fosfo/defosforilazione delle proteine. La via BMP/Smad è regolata da antagonisti extracellulari impedenti l'interazione BMP/recettori quali gremlin, chordin, noggin e follistatina (Nakamura e Yanagita, 2012) e la loro assenza determina difetti morfogenetici (Scarfi, 2016). Esistono percorsi non canonici che sempre via recettori I/II attivano la trasduzione JNK/p38, MAPK/ERK, PI3K/AKT e PKC/RhoA mentre via Smad come illustrato modulano le risposte cellulari indotte da BMP (Moustakas e Heldin, 2005).

La capacità di diverse BMP (BMP2, 4, 6, 7 e 9) di indurre *in vitro* condrogenesi a partire da cellule staminali mesenchimali (MSC) umane, ha stimolato a testarne il potenziale condrogenico per eventuali applicazioni cliniche nell'ingegneria dei tessuti di riparazione della cartilagine (cit. da Scarfi, 2016). Le MSC del midollo osseo sono da considerarsi cellule adulte multipotenti per la loro capacità di auto-rinnovarsi e differenziarsi in più linee fungendo da fonte di progenitori osteocondrali in grado di invadere il sito della frattura, proliferare e differenziarsi in osso e cartilagine (Pittenger, 1999). A causa di queste capacità mostrate dalle MSC e quindi dalle loro riconosciute potenzialità cliniche nell'ingegneria tissutale rigenerativa, molte ricerche stanno tentando di identificare i fattori che controllano l'osteogenesi via MSC, ad esempio TGF- β 1, 2 e 3, BMPs and PDGF) (Del Rosario et al., 2015; Moustakas et al., 2009).

Oltre alla già citata capacità delle BMP2, 4, 6, 7 e 9 di indurre *in vitro* condrogenesi, è riportato in letteratura che BMP2 e 7 migliorano i processi rigenerativi della cartilagine *in vivo* e aumentano la capacità di promuovere la differenziazione in senso condrogenico delle MSC in coltura (Estes et al., 2006; Majumdar et al., 2001; Scarfi, 2016). Però, nonostante l'uso combinato di cellule precursori e BMP in scaffold adatti per la riparazione della cartilagine sia considerato essere un campo di ricerca molto promettente e attivamente perseguito in questi anni, fino ad oggi, in realtà, solamente un numero abbastanza limitato di studi è presente in letteratura. Muovendoci idealmente dal tessuto connettivo, cartilagine e osso, al tessuto epiteliale, osserviamo come in un recente lavoro, (Tadokoro et al., 2016)

l'utilizzo del cosiddetto "saggio delle tracheosfere", attraverso l'utilizzo di organoidi in vitro, ha permesso di identificare come BMP alcune delle molecole segnale che controllano l'epitelio pseudostratificato dell'apparato respiratorio, costituito da cellule ciliate e cellule secernenti sul versante luminale e cellule staminali/progenitrici più basali. I risultati suggeriscono che il segnale BMP di norma limiti la proliferazione allo stato stazionario e che questo freno venga rilasciato transitoriamente durante la riparazione successiva a un danno tissutale dalla upregolazione degli antagonisti dei BMP endogeni. E' stato evidenziato che la via canonica delle BMP promuove la proliferazione cellulare ma non il differenziamento, mentre la BMP4, esogena, inibisce sia proliferazione che differenziamento. Durante le fasi iniziali del processo di riparazione, aumenta la densità delle cellule epiteliali lungo la lamina basale, e solo successivamente la densità ottimale viene nuovamente ripristinata grazie all'estrusione attiva di cellule apoptotiche. Un antagonista delle BMP, LDN-193189, somministrato durante la riparazione tissutale di danni indotti *ad hoc*, dapprima ha visto un aumento della numerosità delle cellule epiteliali ma, dopo la fase di eliminazione, ne ha comunque permesso il ripristino della densità normale. Ecco che emerge un ruolo cruciale della segnalazione BMP sia per il recupero del tessuto epiteliale danneggiato, sia per il mantenimento della sua omeostasi (Tadokoro, 2016). In generale è chiaro che il pathway di segnalazione della TGF- β Superfamily sia un target obbligato per lo studio dei fattori di controllo di proliferazione e differenziamento cellulare in

biologia, non solo per quanto riguarda la biologia dello sviluppo ma anche la regolazione dell'omeostasi e della riparazione tissutale.

1.4 Scopo della tesi.

Scopo di questa della tesi è l'individuazione e la caratterizzazione a livello molecolare di fattori di crescita e/o delle citochine coinvolti nella rigenerazione tissutale e nella deposizione della matrice extracellulare del porifero marino mediterraneo *Chondrosia reniformis*.

Nonostante l'evidente interesse scientifico e tecnologico per questa spugna ad oggi sono poco noti meccanismi molecolari che regolano la rigenerazione tissutale e la deposizione di matrice extracellulare. La recente analisi del trascrittoma di questa spugna (Pozzolini et al. 2015) ottenuta nel laboratorio di Biologia Molecolare/Biotecnologie Marine del DISTAV, dove ci si è proposto di sviluppare questo progetto di ricerca, ha offerto per la prima volta un valido strumento per l'indagine molecolare dei trascritti di *Chondrosia* implicati nella crescita e nel differenziamento tissutale di questo animale primitivo utilizzando come modello i fragmorph di questa spugna.

Prendendo spunto dalla letteratura sulle proteine coinvolte nella rigenerazione dei tessuti connettivi ed epiteliali, i processi di ricostituzione cellulare dello strato esopinacocitario e di deposizione di matrice extracellulare, e prestando particolare attenzione ai collagene, si è tentato di individuare i principali fattori di crescita, le citochine e i morfogeni considerati chiave di questi processi, concentrandosi sulla

superfamiglia del TGF-beta e le BMPs (Barrientos et al., 2008) e di valutarne attraverso l'analisi del trascrittoma di *C. reniformis* la presenza e il livello di conservazione evolutiva nell'animale più primitivo, cioè la spugna.

A una iniziale e approfondita analisi *in silico* delle sequenze si è fatto seguire il clonaggio molecolare e le informazioni ottenute sono state quindi utilizzate nell'analisi dell'espressione genica di queste molecole nel fragmorph usato come modello.

1.5 Approccio sperimentale.

Si è studiata nel tempo l'espressione degli mRNA dei fattori di crescita, appartenenti alla superfamiglia del TFG- β , individuati all'interno del trascrittoma disponibile, in serie di fragmorph in via di rigenerazione in conseguenza al taglio del carotaggio. Parallelamente si è proceduto all'osservazione microscopica dei processi di rigenerazione a livello cellulare utilizzando le diverse tecniche microscopiche disponibili. Lo scopo è stato individuare la fonte delle cellule che attivamente determinano la ricostituzione dello strato esopinacocitario che va a ricoprire la matrice di collagene scoperta dal taglio. A tal fine si è osservata la migrazione cellulare sia con l'osservazione dello strato esterno mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) sia in sezioni istologiche. Di seguito si è messa a punto una metodica di ibridazione in situ (ISH), per cercare di identificare in modo puntuale le cellule che producono i suddetti trascritti all'interno del fragmorph stesso

adattando protocolli esistenti specifici per organismi marini filogeneticamente antichi (Candiani, 2015).

Anche per quanto riguarda l'approccio immunoistochimico si è prevista una prima indagine *in silico* volta ad individuare il livello di conservazione proteica delle sequenze dei fattori presi in esame in modo da poter scegliere anticorpi commerciali diretti su domini conservati che potessero riconoscere le proteine di spugna eventualmente identificate. L'utilizzo di anticorpi (antibodies, Ab) commerciali in poriferi si è dimostrato infatti valido per studiare presenza e distribuzione di proteine conservate (Ramoino et al., 2011, 2007; Ledda et al., 2013). Tali Ab sono stati quindi utilizzati per osservare la scansione temporale di espressione e la localizzazione nei fragmorph di fattori di staminalità della spugna implicati nella rigenerazione dei tessuti e nella deposizione della matrice extracellulare.

Inoltre, grazie all'analisi *in silico* dei recettori dei suddetti fattori di crescita e citochine, e del loro livello di conservazione evolutiva, si sono potuti scegliere alcuni agonisti e/o antagonisti in grado di interferire con i segnali molecolari dei loro ligandi naturali. Tali inibitori farmacologici sono stati utilizzati nel modello costituito dai fragmorph per valutare il contributo dei fattori di crescita della superfamiglia del TGF sia ai meccanismi di crescita sia alla deposizione del collagene nelle spugne. Si è studiato il contributo al fenomeno di rigenerazione attraverso l'espressione dei geni per due diverse forme di collagene presenti, dell'enzima prolil 4-idrossilasi, l'enzima chiave della sua biosintesi, e del tropocollagene mediante test *ad hoc*.

2. MATERIALI E METODI.

2.1 Approvvigionamento e mantenimento delle spugne.

I campioni di *C. reniformis* (Immagine 10) provengono dal Promontorio di Portofino (Immagine 11), da 10/20 m di profondità, raccolti da subacquei professionisti dell'Università di Genova. I campioni sono stati regolarmente raccolti 3-4 volte l'anno all'interno di un programma di monitoraggio a lungo termine (> 30 anni) della comunità bentonica nell'Area Marina Protetta di Portofino. L'area di raccolta è caratterizzata da un pendio roccioso, tra 15 e 20 m di profondità, con una bassa torbidità e la presenza di un flusso di corrente unidirezionale. L'area è esposta a nord-est e subisce l'influenza della vicina città di Santa Margherita Ligure, principalmente a causa di un vortice che tiene in terra i rifiuti urbani e il flusso del vicino fiume Entella (Ruggieri et al., 2006). I regimi locali in parte reindirizzano i deflussi delle acque reflue delle città costiere del Golfo del Tigullio e i detriti provenienti dai riempimenti periodici delle spiagge dirigono verso la scogliera di Paraggi, aumentando il carico organico e la torbidità (Bertolino et al., 2016). La temperatura del mare nella zona di prelievo presenta un'escursione compresa tra 14-22°C durante tutto l'anno. L'Area Marina Protetta (AMP) circonda l'area naturale protetta terrestre del Parco Naturale Regionale di Portofino (PNRP) del promontorio di Portofino. Pertanto, i regolamenti di questa area marina protetta includono forti restrizioni sull'agricoltura, l'allevamento di animali e altre attività umane nella zona terrestre summenzionata, area estrattiva che circonda immediatamente l'area marina protetta. In effetti, le uniche persone autorizzate a svolgere attività agricole

nell'area del parco naturale regionale di portofino sono piccole aziende agricole a conduzione familiare. Le grandi attività agricole sono vietate, quindi non vi si ritrova nessuna quantità significativa di fertilizzanti e altri inquinanti. Un limitato apporto di sostanze proviene dalle attività antropogeniche delle vicine cittadine di Rapallo e Chiavari. La temperatura del mare al momento del prelievo era compresa tra 14 e 16°C alla profondità di raccolta che variava da 10 a 20 m. Ad ogni raccolta si ottenevano un numero variabile di 6-8 campioni di spugna. Per questo motivo la temperatura durante il periodo di contenimento e durante gli esperimenti è stata sempre mantenuta a 14, 15°C durante il rapido trasferimento in laboratorio. Al momento della raccolta gli esemplari di spugna apparivano in buona salute, erano della loro tipica colorazione (nero, marrone scuro o beige), di consistenza dura e liscia, con una superficie lucida, e non si vedevano segni di danni o patologie in essere.

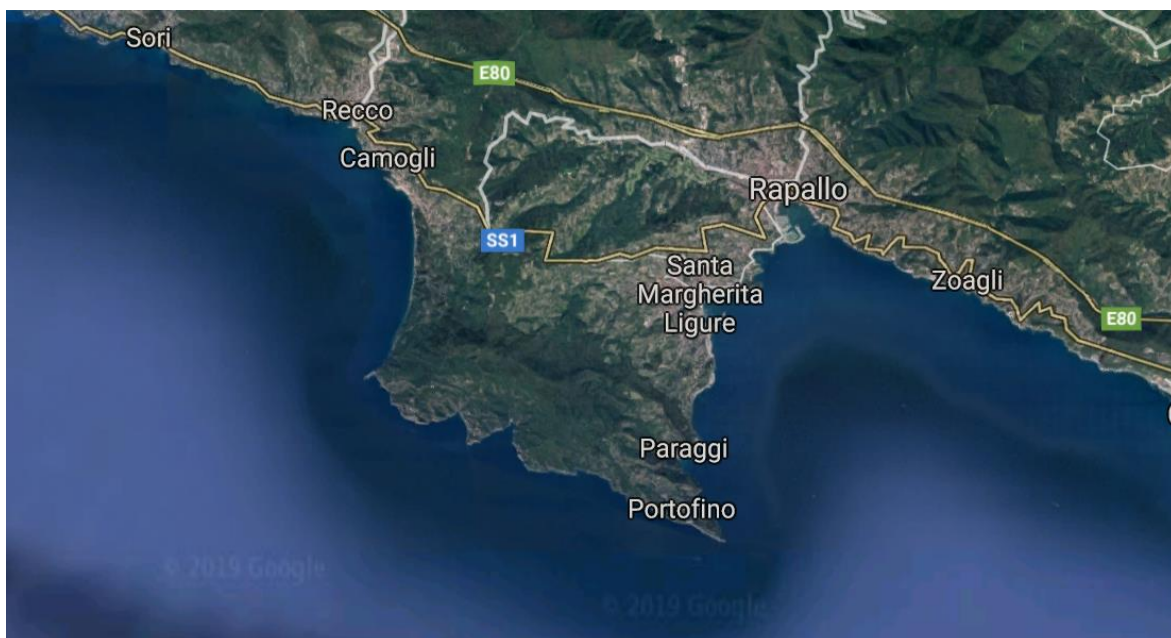
In laboratorio le spugne sono state mantenute in vasche di circa 250 litri, contenenti acqua di mare naturale, filtrata e fornita dall'Acquario di Genova, mantenuta (indicata come filtered natural sea water, FNAW) alla temperatura costante di 14°C e salinità del 37‰. Gli acquari erano forniti di impianto di aerazione, sistema di illuminazione con ciclo 16/8 h, dotato di due lampade da 25 W, solare e fitostimolante rispettivamente, impianto di filtrazione a caduta, schiumatoio e plastic balls necessarie per la crescita del biofilm batterico e collegate ad impianti di refrigerazione Hailea (RPC) (HC- 1000A) o Teco (Bo, Italia) (Tr15). L'alimentazione è stata fornita ogni tre giorni mediante alimento in sospensione per coralli e spugne

della Elos (Vr, Italia) e considerato il bassissimo carico delle vasche si è provveduto a somministrare 300 microlitri di sospensione in un'unica soluzione ogni tre giorni per vasca. Tutti gli acquari, prima di essere utilizzati, venivano caricati con alcune rocce vive provenienti dalla stessa area di campionamento, sul fondo delle vasche erano posizionate alcune conchiglie e i filtri erano avviati con l'utilizzo di attivatori per acquari marini, sempre della Elos (Vr, Italia), ElosAquaUnuM, utilizzati secondo le indicazioni del produttore. Un periodo variabile, di alcune settimane, era necessario per far maturare i filtri. Durante la stabulazione delle spugne si procedeva giornalmente a testare le acque per diversi parametri: temperatura, pH, salinità; settimanalmente contenuto in ammoniaca; Nitriti e Nitrati bisettimanalmente. Mentre i primi tre parametri erano testati strumentalmente, per quanto riguarda i secondi tre si sono utilizzati i kit di diverse ditte, prevalentemente Tetra (Melle, Germany). La temperatura era mantenuta costante, e tutte le vasche erano dotate di impianto termostato e la stanza degli acquari stessa era climatizzata. Il pH veniva misurato al mattino, e si manteneva in un intorno del valore di pH 8. Eventuali variazioni di pH sono state compensate con parziali ricambi di acqua effettuati con acqua fresca filtrata proveniente dall'Acquario di Genova. La continua tendenza degli acquari ad aumentare la propria salinità veniva compensata con l'aggiunta di acqua bidistillata fatta gocciolare in acquario e dalla parziale sostituzione dell'acqua in uso con acqua fresca. Normalmente ammoniaca e nitriti rimanevano ampiamente sotto il limite di rivelazione dei kit, mentre i nitrati si aggiravano a circa 12,5 mg/L. Si sono avuti alcuni eventi di aumento repentino di

ammoniaca e nitriti, in concomitanza con la perdita di alcuni esemplari. In questi casi si è intervenuto con parziale ricambio di acqua e posizionamento in acquario di un filtro a carboni attivi che veniva rimosso appena i parametri fossero rientrati, solitamente in due giorni. Nel momento dell'asportazione del filtro si procedeva nuovamente all'alimentazione per compensare l'assorbimento da parte del filtro stesso della materia organica in sospensione. I pochi individui che si sono ammalati durante i tre anni di lavoro in alcuni degli acquari sono stati non solo prontamente rimossi ma sottoposti ad indagine microbiologica per identificare la presenza di batteri o funghi eventuali ed è stato identificato un agente patogeno fungino, che è risultato essere *Aspergillus tubingensis*, mentre nei filtri, nelle acque e nell'aria dello stabulario non sono stati rilevati patogeni. I dati relativi al controllo microbiologico degli acquari e all'identificazione di questo agente fungino come patogeno di *C. reniformis* sono oggetto di un lavoro attualmente sottomesso e sotto revisione svolto in collaborazione con il Laboratorio di Micologia del DiSTAV dell'Università di Genova. La manutenzione ordinaria delle vasche prevedeva la pulizia del fondo, per aspirazione, se valutata necessaria, e la raschiatura di eventuali alghe che si fossero iniziate a formare sulle pareti attraverso apposito strumento magnetico.



(Immagine 10) *C. reniformis* nel suo ambiente nella zona di Portofino (Foto Marco Bertolino)



(Immagine 11) Da Google Map. Promontorio di Portofino.

2.2 Stabulazione dei fragmorph di *C. reniformis*.

I fragmorph, mantenuti coperti dall'acqua per evitare la formazione di nocive bolle di aria, appena ottenuti e sciacquati in acqua di mare filtrata, venivano posti immediatamente in piastre per colture cellulari (da 12 pozzetti) di dimensioni *ad hoc* negli acquari di stabulazione dove potevano portare avanti il processo di rigenerazione.

Per gli altri test che richiedevano l'utilizzo di inibitori o marcatori, i fragmorph sono stati mantenuti in piastre di maggiori dimensioni (da 6 pozzetti) e posti in incubatori termostatati insieme ai controlli sperimentali.

2.3 Analisi del trascrittoma.

L'analisi di sequenze TGF-like si è basata sul trascrittoma analizzato annotato blastando tutti i 19.000 isotig presenti contro il database proteico Refseq. E' stato consultato il database ottenuto per identificare sequenze omologhe a TGF\BMP, senza risultato, quindi con l'aiuto del bioinformatico il Dott. Stefano Ghignone (CNR, Torino), è stato realizzato un database su piattaforma virtuale Linux, in grado di contenere tutti gli *isotig* derivanti dall'assemblaggio delle reads ottenute dal sequenziamento del trascrittoma compatibile per gli algoritmi di allineamento utilizzati dal sistema utilizzato per l'analisi, BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). E' stato così possibile, utilizzando le sequenze proteiche di BMP o TGF come query, prevedere la ricerca, manualmente, semi-automaticamente, di possibili sequenze con omologia nel trascrittoma. Le

query previste corrispondevano alle sequenze dei TGF1 e 2 umane e del porifero *A. queenslandica*, e le sequenze delle BMP2, 4 e 6 di *Amphimedon queenslandica*. Il trascrittoma è stato interrogato per individuare le sequenze delle subunità recettoriali per i TGF e per due geni la cui espressione è considerata specifica di cellule staminali nelle spugne: Piwi e Musashi.

2.4 Condizioni di rigenerazione sperimentali.

I campioni scelti di *C. reniformis* vengono prelevati dalle vasche degli acquari e trasferiti immediatamente in contenitori contenenti FNSW alla stessa temperatura dell'acqua delle vasche. Gli espianti (fragmorph) consistono in carotaggi eseguiti con carotatori manuali, sterili, cilindrici e di calibro di 9 millimetri, in base alle richieste sperimentali, con un'altezza variabile in relazione allo spessore delle spugne, non identico in tutti i punti, secondo il metodo di Nickel e Brümmer, 2003 (cit). I fragmorph sono poi mantenuti in piastre di plastica da coltura cellulare sterili da 12 pozzetti cadauna, (well plate) in vasche di acquario dedicate, per il tempo necessario all'esperimento. I tempi variavano a seconda degli esperimenti, e i fragmorph venivano lasciati a rigenerare e prelevati per le analisi con combinazioni di intervalli di tempo come qui indicato: 3, 6, 24, 48, 72, 144 ore.

Il carotaggio genera ogni volta un nuovo organismo autonomo, considerabile tale almeno entro i tempi utilizzati per la sperimentazione, e si suppone che ogni fragmorph abbia le stesse caratteristiche generali di ogni altro, eliminando la variabilità che si presenterebbe effettuando esperimenti con singoli esemplari

differenti di spugna. Nel fragmorph rimane quindi scoperto il bordo superiore laterale dell'ectosoma, il mesoilo e il coanosoma oltre che ovviamente il bordo inferiore laterale della porzione basale caratterizzata da uno spesso strato di collagene estremamente compatto, e che era in origine a contatto con il substrato. Appoggiando lo strato basale intatto al fondo di plastica sterile delle piastre si mantiene la polarità alto/basso, non interferendo quindi con le attività di rigenerazione. Questo approccio permette di effettuare le analisi biomolecolari e istologiche volute, mirate in particolare nel nostro caso ai fenomeni di rigenerazione, nelle zone esposte e immediatamente prossime alle zone di taglio dei carotaggi, diminuendo o eliminando del tutto la variabilità costituita dall'utilizzo di organismi diversi. Durante tutti i tre anni è stata prevista la disponibilità di diverse vasche per le specifiche diverse attività.

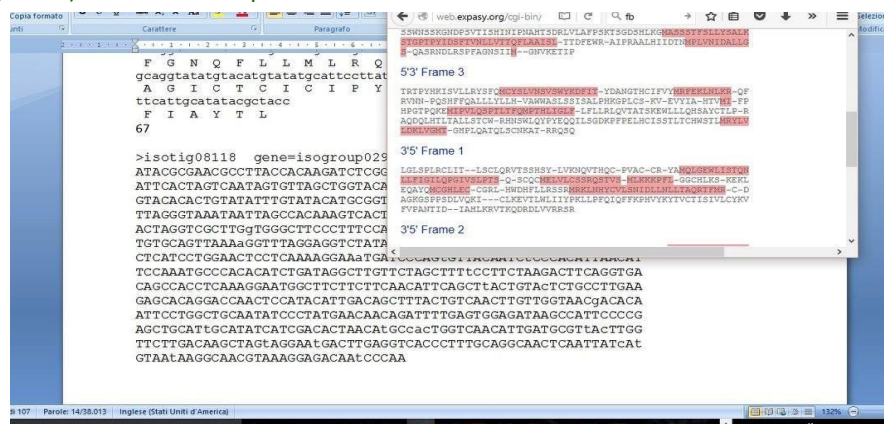
2.5 Identificazione dei membri della superfamiglia TGF β (e TGF β r)

I membri della superfamiglia TGF β e i correlati TGF β r sono stati identificati dal trascrittoma di *C. reniformis* precedentemente sequenziato e assemblato (Pozzolini et al., 2016). Il trascrittoma era stato ottenuto all'interno di una ricerca che, contestualmente alla prima identificazione nei poriferi, proprio in *Chondrosia reniformis*, di un membro della superfamiglia del fattore di necrosi tumorale, lo aveva caratterizzato a livello molecolare e ne aveva studiato l'espressione insieme ad un suo recettore putativo, (Pozzolini et al., 2016). Per l'identificazione delle proteine putative appartenenti alla superfamiglia delle TGF β , in questa tesi, è stata

eseguita una analisi del trascrittoma utilizzando la funzione tblastn ed impiegando come query la sequenza del TGF β umano, di *A. queenslandica* o il solo dominio TGF β . La funzione tblastn confronta la sequenza delle proteine indagate con il database in Blast dopo aver tradotto ogni sequenza nucleotidica in una proteina ed usando tutti e sei i frame di lettura. L'applicazione blastn è molto sensibile nella ricerca potendo utilizzare dimensioni di ricerca breve rispetto ad altre soluzioni. Per questo motivo, blastn è considerato ideale all'interno di Blast per trovare allineamenti alle sequenze nucleotidiche correlate ad altri organismi. L'algoritmo di "BLAST nucleotide" trova sequenze simili interrompendo la query in brevi sotto sequenze chiamate *word*. Il programma identifica poi esattamente le corrispondenze con le parole della query (hits di word). Il programma BLAST estende quindi questi *hits* di word in più passaggi per generare gli allineamenti finali in sequenza. "Query di proteine vs database tradotto (tblastn)" è utile per trovare omologhi proteici in dati nucleotidici non annotati. Una ricerca tblastn consente di confrontare una sequenza di proteine con le traduzioni a sei frame di un database nucleotidico. Viene considerata una via produttiva per identificare "regioni di codifica proteiche omologhe in sequenze nucleotidiche non annotate" come i tag di sequenza espressa (ESTs) e i record di genoma draft (HTG), che si trovano rispettivamente nei database BLAST est e htgs. Gli EST sono sequenze di cDNA a breve lettura singola. Comprendono il più grande pool di dati di sequenza per molti organismi e contengono porzioni di trascrizioni da molti geni non caratterizzati. Poiché gli EST non hanno sequenze di codifica annotate, non ci sono traduzioni di proteine corrispondenti nei database delle

proteine BLAST. Quindi una ricerca tblastn è considerata come l'unico modo per cercare queste potenziali regioni codificanti a livello di proteine. Le sequenze HTG, sequenze di bozze di vari progetti di genoma o di grandi dimensioni, i cloni genomici sono da considerare un'altra grande importante fonte di regioni codificanti ancora non annotate (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST_guide.pdf). All'interno delle diverse sei possibili configurazioni si è tenuto conto solo della soluzione che si poteva considerare rappresentativa. Si sono considerate quindi le sequenze amminoacidiche delle singole proteine e le si sono *blastate* contro un database nucleotidico, come query, blastando con tblastn, nello specifico mediante una applicazione *ad hoc* scritta per girare sotto il sistema operativo Linux (Immagine 12). Per i TGFs, il trascritto putativo di *A. queenslandica* e gli ortologi genetici dei bilateri sono stati utilizzati nelle ricerche con tblastn nel trascrittoma del *C. reniformis* mentre i trascritti TGFr candidati sono stati identificati direttamente attraverso la ricerca di sequenze omologhe grazie alla suite BLAST (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

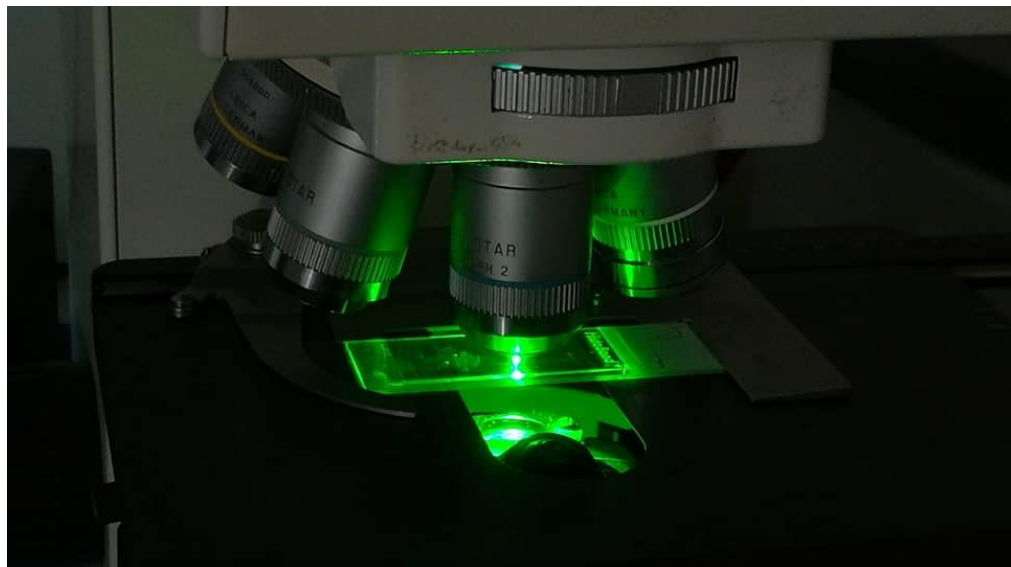
(Immagine 12) Analisi delle sequenze nucleotidiche.



2.6 Osservazioni istologiche in microscopia luce.

I fragmorph di *C. reniformis* sono stati recuperati dai contenitori di plastica (ai tempi 0, 24, 48, 72, 120, 144 ore), lavati con acqua di mare naturale filtrata (FMSW) e fissati per una notte a 4°C in paraformaldeide al 4% (PAF) (Carlo Erba Reagents, Milano, Italia) in soluzione di tampone fosfato marino (PBS) 0,1M pH 7,4 ed NaCl al 37‰ (alla temperatura di 4°C). Dopo la fissazione alcuni campioni sono stati lavati ripetutamente con PBS 0,1M pH 7,4 ed NaCl al 8‰ e posti in alcool 70° per il mantenimento nel lungo periodo. I campioni da utilizzare sono stati lavati a loro volta, disidratati in scala ascendente di alcoli fino all'assoluto e inclusi in Paraplast (McCormick, IL, USA) a 56°C previo passaggio in agente sostitutivo dello xilolo, Bioclear (Bio-Optica Italy). I campioni inclusi sono stati sezionati al microtomo in sezioni di 6 µm di spessore. I vetrini per microscopia ottica sono stati colorati con colorazione Ematossilina ed Eosina (EE) per risolvere la struttura generale interna dei campioni, Picro Sirius Red (PSR), per mettere in evidenza le fibre di collagene e il loro calibro, mediante osservazione in microscopia polarizzata (Junqueira et al., 1979) e Tricromica di Masson (MT) utilizzata per evidenziare la distribuzione del collagene evidenziando contemporaneamente l'anatomia interna. Il metodo PSR è stato utilizzato per la sua capacità di colorare in modo differenziale le varie fibre di collagene; in particolare se in campo chiaro il collagene appare rosso, quando viene esaminato con la microscopia ottica a polarizzazione incrociata, le sue fibre di calibro maggiore appaiono di colore giallo o arancione brillante a causa della birifrangenza, e corrispondono nei Vertebrati al collagene di tipo I, mentre le sue fibre più sottili,

comprese quelle reticolari nei mammiferi, risultano verde brillante, corrispondente al collagene di tipo III di vertebrato (Junqueira et al., 1979). Tutte le sezioni colorate sono state visualizzate attraverso un microscopio Leica DMRB ad epifluorescenza (Leica microsystems, Milano, Italia) (Immagine 13) equipaggiato con polarizzatori incrociati e filtri di contrasto ad interferenza differenziale (Nomarski) e utilizzando prevalentemente un obiettivo Leica da 40 (apertura numerica di 0,65). Le immagini sono state acquisite con una camera CCD Leica DFC420C (microsistemi Leica) e analizzate mediante il software open source ImageJ (Rasband 1997-2016). Si è tentata l'identificazione di marcatori cellulari aspecifici, come già testato in letteratura ad esempio in *Suberites domuncula*, testando un panel di lectine standard, tra le quali solo il White Germ Agglutinin (WGA), ha restituito risultati e si sono utilizzati Ab anti-Tubulina Acetilata (TubAc) per evidenziare i flagelli dei coanociti.



(Immagine 13) Esempio di campione in microscopia ad Epifluorescenza

2.7 Microscopia ESEM

Per l'osservazione dei fragmorph mediante microscopia elettronica a scansione ambientale (Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM) questi sono stati prelevati per effettuare i diversi esperimenti e le diverse osservazioni (ai tempi 0, 24, 48, 72, 120, 144 h), lavati con FNSW e fissati con una miscela di paraformaldeide al 2% e di glutaraldeide al 2,5% a pH 7,4 per 4h, disidratati passando attraverso una serie di soluzioni alcoliche di etanolo con concentrazione crescente fino al 100% mantenuto disidratato con l'aggiunta di silice disidratata in stufa (Immagine 14). I campioni sono stati ulteriormente disidratati mediante trattamento al critical-point con CO₂ quindi ricoperti di grafite e infine osservati. L'osservazione e l'acquisizione delle immagini sono state eseguite con un ESEM Vega3-Tescan, tipo LMU (Tescan, Brno, Rep. Ceca) equipaggiato con un sistema di micro-analisi EDS-Apollo_x e il software EDS Texture and Elemental Analytical Microscopy (TEAM) (Immagine 15).



(Immagine 14 e 15) Preparazione e osservazione campioni al SEM

2.8 Microscopia elettronica a trasmissione TEM; colorazione di contrasto.

Per l'osservazione dei fragmorph mediante microscopia elettronica a trasmissione (Transmission Electron Microscope, TEM) questi sono stati prelevati (sono stati utilizzati solamente i tempi t0 per poter descrivere la situazione nell'animale in condizioni normali), lavati con FNSW e fissati con una miscela di paraformaldeide al 2% e di glutaraldeide al 2,5% a pH 7,4 per 4h, poi lavati in PBS ripetutamente e impregnati con PBS saccarosio 2,3 M, quindi congelati in azoto liquido e criosezionati all'ultramicrotomo. Le criosezioni ultrasottili sono state ottenute con un Reichert-Jung Ultracut E con attacco crio FC4E e raccolte su griglie rivestite di rame rivestite di carbonio, trattati con PAF al 2% in PBS 0,1 M (pH 7,4) per 20 min a temperatura ambiente (room temperature, rt) e lavati in PBS 0,1 M (pH 7,4). Le griglie sono state parzialmente asciugate, sono state lavate toccandole tre volte sulla superficie di una goccia di acqua distillata, quindi contrastate con acetato di uranile al 2% in acido ossalico 0,15 M per 5 min e altri 5 min in una miscela 9: 1 di acetato di uranile 2% e metilcellulosa 25 ctp. I campioni di FS sono stati osservati con un microscopio elettronico a trasmissione Philips CM10 dotato di fotocamera Megaview 3 e software iTEM Olympus SIS per l'acquisizione di immagini digitali.

2.9 Identificazione delle cellule staminali della spugna

Musashi è una proteina legante l'RNA evolutivamente conservata che regola lo stato delle cellule staminali in vari organismi. Geni omologi di Musashi (Msi) sono espressi in cellule staminali di spugna (Archeociti) e sono considerati i loro specifici marcatori

molecolari (Funayama 2010). Il primo gene considerato specifico delle cellule staminali nelle demospongie è stato infatti proprio un omologo di Musashi (Okamoto et al., 2012) EflMsiA, un paralogo di Musashi, è specificatamente espresso in cellule staminali (archeociti) nella spugna d'acqua dolce *Ephydatia fluviatilis*, appartenente alle demospongiae. Quando gli archeociti entrano nella fase M, la proteina EflMsiA diffonde nel citoplasma. Gli archeociti possono quindi essere definiti molecularmente come cellule che esprimono il MsiA-mRNA e viene suggerito che gli archeociti si dividono simmetricamente sia per l'auto-rinnovamento che per la differenziazione.

Tra le tante molecole implicate nel processo di proliferazione cellulare la proteina PIWI è considerata l'agente che tende alla conservazione della staminalità nelle diverse linee cellulari, tramite la mediazione degli *small* RNA (in questo caso piRNA). Questo può avvenire secondo diverse vie tra le quali la capacità di PIWI di legare i piRNA, che inducono la proteina PIWI stessa alla degradazione, e quindi alla repressione della traduzione, di specifici mRNA complementari. Attualmente è stato dimostrato come PIWI tenda a mantenere la totipotenza/multipotenza in diversi organismi animali. Proteine PIWI-like sono presenti in cellule staminali multipotenti dagli idrozoi ai tunicati fino ai mammiferi e nell'uomo dove sono implicate in processi che avvengono a livello embrionale o tumorale.

Al fine di identificare gli archeociti in *C. reniformis* e nei suoi fragmorph immunoistochimicamente, un trascritto putativo candidato per Musashi (CrMsi) è stato identificato dal sequenziamento del trascrittoma *C. reniformis* (come descritto

in Pozzolini et al 2016). La sequenza N-terminale di Msi umano, utilizzata per evocare l'anticorpo policlonale utilizzato per studiare la distribuzione in *C. reniformis* dell'omologo Musashi, è stata confrontata con quella corrispondente predetta a partire dalla sequenza CrMsi mediante ClustalW per determinare se l'Ab potesse riconoscere CrMsi nei tessuti di *C. reniformis*. CrMsi presenta 26% di identità con la proteina utilizzata per produrre l'anticorpo policlonale E-AB-17518-60 MSI1 Polyclonal Ab (Invitrogen, USA), successivamente utilizzato per identificare la distribuzione di CrMsi in *C. reniformis*. Come Ab II è stato usato Chicken anti Rabbit, coniugato con Alexa 488 (concentrazione finale d'uso 1: 400 in PBS), Molecular Probes, Invitrogen Corporation, CA, USA. I controlli negativi sono stati effettuati mediante omissione del I anticorpo (Saper, 2009; Saper and Sawchenko, 2003).

2.10 Saggio di proliferazione cellulare

Si è usato il kit di proliferazione FLUOS (Roche, Germany) su sezioni criostatiche di fragmorph incubati 12 ore con 5-bromo-2-deossi-uridina (BrdU, 100 μ M) per avere sufficiente incorporazione.

2.11 Cinetica dei coanociti.

In accordo con Ereskovsky et al. (2015), è stato utilizzato un inchiostro commerciale (Indian Ink) costituito da una soluzione di nerofumo, per marcare i corpi cellulari dei coanociti in esemplari vivi di *C. reniformis*. I coanociti, infatti, incorporano il nerofumo e lo mantengono al loro interno fino a quando, esaurito il loro ciclo vitale

di circa 8 ore, si disperdono all'interno dei canali esalanti oppure lo mantengono al loro interno muovendosi nella matrice del coanosoma/mesoilo se impegnati in un processo di transdifferenziamento. Spugne intatte sono state incubate in acqua di mare con il 2% di Indian Ink per 12 ore prima degli esperimenti. L'incubazione per 12 ore permette ai coanociti di assumere una quantità sufficiente di colorante in modo da identificarli. La marcatura avviene nei loro fagosomi. Gli esemplari marcati sono stati lavati in acqua di mare fresca diverse volte. I campioni mantenuti come controllo non hanno mostrato nessun segno di sofferenza. I campioni utilizzati sono stati carotati e i fragmorph derivanti sono stati incubati come da protocollo sperimentale (ai tempi 0, 24, 48, 72, 120, 144 h), campionati e le sezioni sono state osservate previo taglio in paraffina, senza ulteriore colorazione, mediante DAPI o contrasto Nomarsky (DIC).

2.12 Analisi filogenetica

Il posizionamento filogenetico di membri della superfamiglia di TGF e TGFr di *C. reniformis* è stato ottenuto utilizzando l'analisi bayesiana precedentemente pubblicata dei ligandi e dei recettori TGF β dello Ctenoforo *Mnemiopsis leidyi* (Pang et al., 2011), insieme ad altri ligandi e recettori omologhi dalle spugne delle quali erano disponibili i trascrittomi. A tal fine, i trascrittomi di *Amphimedon queenslandica*, *Aphrocallistes vastus*, *Chondrilla nucula*, *Corticium candelabrum*, *Ircinia fasciculata*, *Petrosia ficiformis*, *Pseudospongosorites suberitoides* (Riesgo et al., 2014), *Halisarca caerulea* (Kenny et al., 2018), sono stati poi analizzati mediante

TransDecoder v.5.2.0 (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>, ultimo accesso 2019-03-05), per estrarre le probabili regioni di codifica dalle trascrizioni e per identificare i CDS con omologia a domini proteici noti tramite la ricerca di Pfam. Le annotazioni di Pfam sono state cercate per i termini "TGF_beta" (ligando) e "TGF beta GS" (recettore), e sono stati selezionati solo i peptidi candidati con punteggio parziale completo completo a 5' di entrambe le classi (Tabella 1).

I membri putativi omologhi dei ligandi e dei recettori candidati TGF e TGFr di *C. reniformis* e di altre spugne sono stati aggiunti mediante mafft v.7, (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/add.html>) all'allineamento:

doi:10.1371/journal.pone.0024152.g002 (Pang et al., 2011) e

doi:10.1371/journal.pone.0024152.g004 (albero filogenetico)

già utilizzato per produrre rispettivamente la Figura 2 e la Figura 4, appunto in Pang et al. (2011). Per i ligandi TGF- β , solo il dominio peptidico terminale 3' maturo è stato utilizzato nelle analisi filogenetiche.

Il perfezionamento degli allineamenti è stato fatto con jalview v.2.10.5 (Waterhouse et al., 2009).

L'inferenza bayesiana è stata eseguita per ligandi e recettori con mrBayes v.3.2 (Rohnquist and Huelsenbeck, 2003), utilizzando il modello "misto" di amminoacidi, i tassi di sostituzione gamma e sei ngammacat, con quattro cicli indipendenti di cinque milioni di generazioni, con alberi campionati ogni 100 generazioni.

La visualizzazione e la modifica degli alberi di consenso sono stati effettuati con FigTree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.13 Ibridazione in situ (ISH)

I fragmorph di *C. reniformis* sono stati recuperati (ai tempi 0, 24, 48, 72h), lavati con FMSW RNase free in contenitori sterili RNase-free. (Da questo punto tutte le soluzioni e le attrezzature utilizzate erano RNase-free.) Dopo fissazione over night (o.n) (4°C in 4% PAF in 0,1 M PBS (pH 7,4) i campioni sono stati risciacquati con PBS (20 mM di PBS, 9% di NaCl, pH7,4), immersi in saccarosio al 20% o.n a 4°C, 2h a r.t. in saccarosio 20%/Killik (mezzo di inclusione per il taglio criostatico, Bio-Optica, Italia) in rapporto 1:1, infine in 100% Killik in stampi criogenici e congelati in azoto liquido. I campioni tagliati con uno spessore di 10 µm con un criostato Leica (Germany) CM1900 sono stati conservati a -20°C fino all'uso.

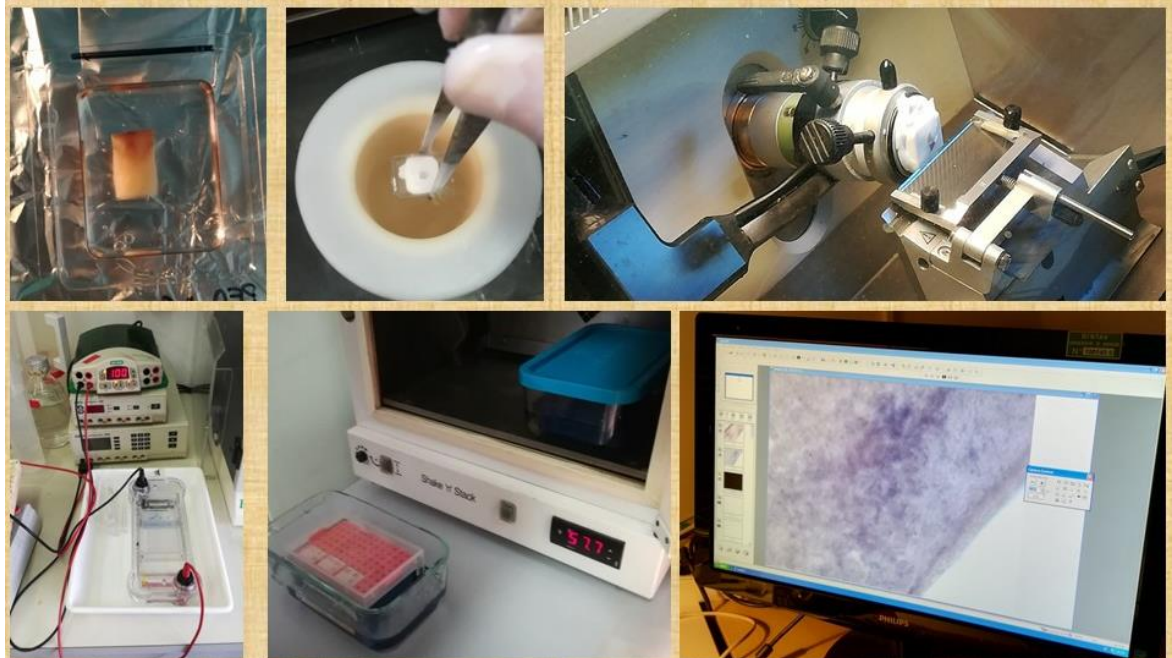
Le sequenze del collagene fibrillare e della proteina TGF6 simile, corrispondente all'isotig 12606, con cui è stata preparata la sonda per l'ibridazione in situ, precedentemente identificate dal trascrittoma di *C. reniformis*, sono state amplificate mediante PCR con primer specifici e clonate nel vettore pCRII-TOPO (Invitrogen, California, USA); i plasmidi ricombinanti sono stati usati per trasformare cellule competenti One Shot TOP10 (Invitrogen, California, USA). Il DNA plasmidico estratto dalle colonie trasformate mediante miniprep è stato sequenziato, linearizzato e purificato mediante estrazione con fenolo/cloroformio/alcol isoamilico seguita da precipitazione con etanolo. Il plasmide così ottenuto è stato utilizzato come stampo per la sintesi *in vitro* delle ribosonde digossigeninate, sia senso sia antisenso, utilizzando il kit DIG RNA Labeling Kit (Roche). Al termine della

trascrizione, le ribosonde sono state purificate via precipitazione con etanolo e risospese in acqua *nuclease-free*. I vetrini, asciugati all'aria, 1 h r.t., lavati in PBS per rimuovere il mezzo di montaggio, sono poi stati trattati per 20 min con tampone RIPA (150 mMNaCl, 5 mM EDTA, 50mM Tris-Cl, 1% IGEpal CA-630, 0,5% sodio desossicolato, 0,1% SDS).

Dopo post-fissazione, 10 min in PAF al 4% in PBS, e lavaggio in PBS, i vetrini sono poi stati trattati con 0,25% di anidride acetica 0,1mM di trietanolamina 15 min, lavati in PBS e pre-ibridati con tampone di ibridazione (formammide 50%, 5x SSC, 0,5 mg/ml di RNA da lievito *Torula*, 50µg/ml di eparina, 0,1% Tween-20) a 60°C per 5h. Le sezioni sono state successivamente incubate con la ribosonda senso o antisenso in tampone di ibridazione a 60°C o.n. I vetrini sono poi lavati 1h in tampone di post-ibridazione (formamide 50%, SSC 2X, Tween-20 0,1%), 20 min in MABT (acido maleico 1M pH7,5, NaCl 5M, 0,1% Tween-20) e poi bloccati con soluzione bloccante (siero fetale bovino 10% in MABT) per 5h.

Le sezioni sono poi state incubate con Ab coniugati con AP anti-digossigenina (1:500 in blocking solution, a 4°C, on). Sciacquate in MABT, e lavate con tampone AP (100 mMTris pH 9,6, 50 mM MgCl₂, 100 mMNaCl, 0,1% Tween-20) per 45 min, le sezioni sono poi colorate con NBT/BCIP (187µg/ml NBT, 175µg/ml BCIP in buffer AP) a tempi variabili.

La colorazione è stata interrotta con lavaggio in PBST (0,1% Tween-20 in PBS). I vetrini sono stati post-fissati con PAF (4% per 10 min), lavati e montati in PBS con glicerolo al 70% (e sodio azide 0,1%).



(Immagine 16) Alcuni passaggi della ISH, dalla preparazione delle sezioni criostatiche, alla preparazione della sonda, l'ibridazione vera e propria e l'osservazione dei risultati.

Questo protocollo, modificato, è basato su: "In Situ Hybridization Methods" pp 279-292 "Detection of mRNA and microRNA Expression in Basal Chordates, Amphioxus and Ascidians" di Candiani et al. (2015) (Immagine 16).

È stato messo a punto con l'utilizzo di una sonda allestita a partire dal trascrittoma di *C. reniformis*, (Pozzolini et al., 2012) diretta contro la forma fibrillare di collagene che si suppone sia prodotta solamente dai lofociti, cellule con funzione di fibroblasti, facilmente riconoscibili per affinità alla WGA, per forma e dimensioni, come osservato al TEM.

2.14 Analisi dell'espressione genica qPCR

L'RNA totale è stato estratto mediante il kit Isol-RNA Lysil (5'-Prime, Eppendorf srl, Milano, Italia), secondo le istruzioni del produttore, dai fragmorph di *C. reniformis* (ai tempi 0, 3, 9, 24, 48, 72, 144 h). Successivamente, la frazione poli-A è stata isolata utilizzando il kit di isolamento per mRNA FastTrack® MAG (Life Technologies, Milano, Italia). Il cDNA di spugna è stato infine ottenuto mediante trascrizione inversa con il kit di sintesi cDNA di iScript (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia), secondo il protocollo del produttore, utilizzando 200 ng di mRNA purificato. Il GAPDH (a.n. KM217385) è stato utilizzato come gene di riferimento per la normalizzazione del campione. Ogni reazione PCR è stata eseguita in 20 µl contenenti: 1x master mix iQ SYBR®Green (Bio-Rad), 0,2 µM di ciascun primer e 0,8 µl di cDNA sintetizzato. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplice copia. Sono state utilizzate le seguenti condizioni: una denaturazione iniziale per 3 min seguita da 45 cicli con denaturazione a 95°C per 15 s, *annealing* e allungamento a 57,7°C per 60 s. La fluorescenza è stata misurata alla fine di ogni fase di allungamento. Il passo successivo è stato un riscaldamento lento (1°C/s) del prodotto amplificato da 55°C a 92°C al fine di generare una curva di temperatura di *melting*. Tutti i primer sono stati progettati utilizzando il software Beacon Designer 7.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto CA, USA) fornito da TibMolBiol (Genova, Italia). Le sequenze di primer di GAPDH, collagene fibrillare (FC), collagene non fibrillare (nFC), fattore di necrosi tumorale (TNF) e recettore TNF (TNFR) sono state riportate in Pozzolini et al. (2016), mentre la prolina-4 idrossilasi (P4H) e la Bcl-2 sono state riportate in Pozzolini et al. (2017). Le sequenze dei primer di Tgf1, Tgf2, Tgf3, Tgf4, Tgf5, Tgf6,

TgfR1, TgfR2, Piwi e Musashi sono riportate nella Tabella 1. I dati sono stati analizzati mediante il software DNA Engine Opticon® 3 Real-Time Detection System Software program (3.03 version). Per rilevare il profilo di espressione genica relativa ai fragmorph in rigenerazione rispetto ai campioni di controllo campionati al tempo zero (steady-state, t 0), è stato utilizzato il metodo della soglia comparativa Ct (Aarskog et al., 2000) e il software Gene Expression Analysis per iCycler iQ Real Time Detection System (Bio-Rad) (Vandesompele et al., 2002).

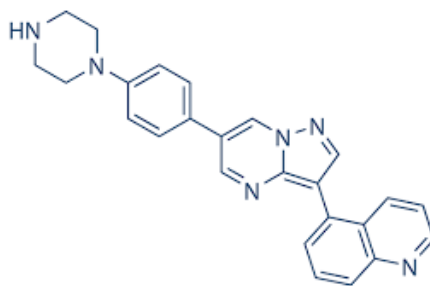
2.15 Saggio tropo-collagene

Il tropo-collagene di nuova sintesi nei fragmorph di *C. reniformis* è stato dosato con il metodo colorimetrico Sircol Assay (Biocolor Ltd, UK) come descritto in Pozzolini et al., (2017). Il contenuto di collagene è stato normalizzato contro il peso degli espianti di tessuto umido.

2.16 Effetto degli inibitori di BMPr e TGFβr

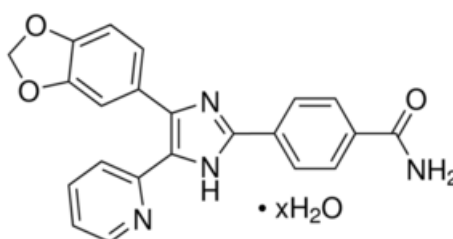
Per indagare il coinvolgimento delle proteine TGF, identificate nel trascrittoma, nel processo di rigenerazione della spugna *C. reniformis* sono stati utilizzati due inibitori specifici che agiscono sui recettori BMPr e TGFβr bloccando la trasduzione del segnale intracellulare:

- Inibitore LDN-212854 (SM0965) - Sigma SML0965 (Immagine 16). E' un inibitore delle chinasi dei BMPr, inibisce il differenziamento osteogenico da BMP6 via ALK2, e da BMP4, via ALK3, (Zhang et al., 2017):



(Immagine 17) Inibitore LDN-212854

- Inibitore SB-431542 (S4317) - Sigma S4317 (Immagine 18). E' un inibitore del TGF β r, diminuisce espressione di collagene e fibronectina, proliferazione e motilità, (Inman et al., 2002):



(Immagine 18) Inibitore SB-431542

L'effetto degli inibitori è stato seguito attraverso l'indagine microscopica, in luce, con l'utilizzo di Sirius Red e Tricromica di Masson, per seguire le variazioni della matrice collagenica, e mediante SEM per studiare il procedere della ricellularizzazione ed osservare la matrice collagenica a livello ultrastrutturale. L'effetto è stato anche oggetto di indagine molecolare attraverso lo studio dell'espressione di Musashi, come indicatore del mantenimento della staminalità, Bcl2, i tre geni procollagenici del collagene fibrillare, non fibrillare e il P4H, utilizzando però il solo LDN-212854, dato che SB-431542 ha mostrato effetti tossici ai tempi più lunghi, incompatibili con le analisi molecolari. I fragmorph di *C. reniformis* sottoposti ad indagine, sono stati collocati in incubatore in piastre a sei pozzetti in FNSW con 2,5 mM di SB-431542, a 14°C, per 24, 72 e 144 h.

2.17 Statistica.

Gli esperimenti sono stati eseguiti tre volte in triplicato. I risultati sono stati testati con paired t-test ai rispettivi controlli o in alternativa con il test one-way ANOVA seguito dal paired Tukey test. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0,05$.

3 RISULTATI

3.1 Analisi del trascrittoma di *C. reniformis*.

L'analisi in silico delle sequenze omologhe al dominio delle proteine della superfamiglia del TGF, è stata effettuata confrontando diverse sequenze proteiche annotate di TGF/BMP della spugna *A. queenslandica* e di TGF β umani con le sequenze nucleotidiche del trascrittoma di *C. reniformis* utilizzando la funzione tBLASTn del database BLAST. Tale ricerca ha identificato 6 trascritti e con lo stesso approccio sono state identificate anche le sequenze di due membri della famiglia dei recettori dei TGF (TGFr) (Tabella 1, Immagine 1C e 1D), nonché le sequenze dei due geni di staminalità Piwi e Musashi

Read Name	Gene Name	Lenght (bp)	Putative AA	GenBank an
<i>TGF Ligands</i>				
isotig04814\04815	TGF1	1639	409 aa	MH687917
isotig10275	TGF2	1357	349 aa	MH687918
isotig09942	TGF3	1490	404 aa	MH687919
HZIY80A02D0KY8	TGF4	543*	135 aa	MH687920
HZIY80A03GGZ1G	TGF5	1342*	394 aa	MH687921
isotig12606	TGF6	908*	224 aa	MH687922
<i>TGFReceptors</i>				
isotig01962\01963	TGFr1	1509*	439 aa	MH687923
isotig09894	TGFr2	1874*	464 aa	MH687924

Tabella 1. Isotig utilizzati all'interno delle query.

3.1.1 Albero filogenetico.

Sono stati ottenuti alberi filogenetici Bayesiani come in figura 1A in base ai TGF β e in figura 1B in base ai recettori del TGF identificati e all'allineamento dei domini dei

peptidi TGF β utilizzati in Pang et al. (2011), lavoro dove sono inclusi taxa rappresentativi di deuterostomi, protostomi e non bilateri (si può confrontare online con la tabella S1 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024152.s001>).

La tassonomia cladistica o sistematica filogenetica è il metodo di classificazione basato sul grado di parentela inteso come distanza temporale dell'ultimo progenitore comune tra diversi organismi viventi. Un *cladogramma* è la rappresentazione del grado di somiglianza reciproca tra diversi soggetti presi in esame in rapporto alla linea filogenetica, è perciò la rappresentazione dei gruppi tassonomici monofiletici, detti *cladi*, aventi ognuno un antenato comune a tutti i discendenti. Le relazioni sono determinate dai diversi caratteri condivisi, le cosiddette *omologie*, presumendo che esse stiano ad indicare un antenato comune. Le strutture omologhe sono quelle che, nei diversi organismi, hanno un'origine comune, indipendentemente dalla funzione, e un esempio classico è costituito dai cheliceri dei chelicerati che sono omologhi alle seconde antenne dei crostacei. Le omologie si contrappongono alle *analogie*, detta anche *omoplasie*. Due caratteri che non hanno un'origine comune ma condividono la stessa funzione sono detti *analoghi*. L'esempio classico è dato dalle ali degli insetti che sono analoghe alle ali degli uccelli, ma evolutivamente sono ben distinte. Quindi, dato che un'indagine di tipo cladistico si basa sull'identificazione delle omologie presenti in un gruppo in studio, si può avere:

l'analisi fenetica: basata sulle similarità o dissimilarità tra gli organismi che permette di determinare quanto simili tra di loro siano due o più organismi;

l'analisi *filogenetica* che invece si basa sulla distanza genetica tra coppie di sequenze e spiega quanto due o più organismi siano evolutivamente vicini.

La nostra analisi filogenetica è stata effettuata tenendo conto dei membri di *C. reniformis* TGF e TGFr e dell'analisi bayesiana dei TGF e TGFr dello ctenoforo *Mnemiopsis leidyi* (Classe *Tentaculata*, Ordine *Lobata*, Famiglia *Bolinopsidae*) e delle spugne di cui fossero disponibili i trascrittomi. Sull'albero le diverse specie coinvolte nello studio sono state indicate rispettivamente: **Ava** *Aphrocallistes vastus*, (Classe *Hexactinellida*, Ordine *Hexactinosida*, Famiglia *Aphrocallistidae*); **Cnu** *Chondrilla nucula* (Classe *Demospongiae*, Ordine *Chondrosida*, Famiglia *Chondrillidae*); **Cca** *Corticium candelabrum*, (Classe *Homoscleromorpha*, Ordine *Homosclerophorida*, Famiglia *Plakinidae*); **Hca** *Halisarca caerulea* (Classe *Demospongiae*, Ordine *Chondrosida*, Famiglia *Halisarcidae*); **Ifa** *Ircinia fasciculata* (Classe *Demospongiae*, Ordine *Dictyoceratida*, Famiglia *Irciniidae*); **Pfi** *Petrosia ficiformis* (Classe *Demospongiae*, Ordine *Haplosclerida*, Famiglia *Petrosiidae*); **Psu** *Pseudospongosorites suberitoides* (Classe *Demospongiae*, Ordine *Hadromerid*, Famiglia *Suberitidae*). *Chondrosia reniformis* (Classe *Demospongiae*, Ordine *Chondrosida*, Famiglia *Chondrillidae*) è stata invece considerata senza tag per default essendo rappresentata dai nostri isotig di riferimento.

E' stato possibile osservare che la filogenesi dei geni paraloghi provvisti del **dominio a sette cisteine** caratteristico, escludendo le sequenze che non sono ascrivibili né al gruppo dei TGF β né al sottogruppo delle BMP od esclusive delle Homoscleromorpha, rispetta la ripartizione tassonomica dei poriferi, per quanto

riguarda le specie considerate e in base ai dati attualmente disponibili in letteratura. Il TGF1 corrispondente a due isotig 04814 e 04815 si trova a due nodi di distanza da **Hca** e **Cnu** e un nodo da **Aq**, tutte *Demospongiae*. Il TGF2 corrispondente all'isotig 10275, si trova a un nodo di distanza da **Ava**, una *Hexactinellida* e due nodi da **Cnu** *Demospongiae*. Il TGF3, isotig 09942 si stacca con un nodo da **Cnu** e **Hca**, *Demospongiae*. Il TGF4, HZIY80A02D0KY8 si stacca da **Hca** *Demospongiae* con un nodo. Il TGF5, HZIY80A03GGZ1G dista 3 nodi da **Cca** *Homoscleromorpha*. Il TGF6, isotig12606 è distante tre nodi da **Cca** *Homoscleromorpha* e da **Psu** *Demospongiae* e due da **Cnu** e **Hca** *Demospongiae*.

Per quanto riguarda i **recettori**, si è potuto osservare in **figura 1B** che i quattro recettori di **Aq** che sono inclusi nelle analisi Bayesiane mostrate nella Figura 4 nel lavoro di Pang et al. (2011), sono raggruppati a due a due in due differenti cladi: Aqu_1.227949 e Aqu_1.227950 nel clade dei recettori di Tipo I e Aqu_1.224888 e Aqu_1.224889 in quello di tipo II.

Nel nostro lavoro tutti i nuovi recettori putativi per TGF identificati dalle spugne clusterizzano nel gruppo di Tipo I. In particolare, le sequenze corrispondenti agli Isotig01962_p1 e isotig01963_p1 di *C. reniformis*, formano un cluster ben supportato con Aqu_1.227950 (1 probabilità a posteriori), insieme con gli omologhi da **Psu**, **Ava**, e **Cnu**, mentre la sequenza isotig09894_p1, insieme con gli omologhi di **Hca**, **Cnu** e **Pfi**, formano un cluster con Aqu_1.227949 supportati da una probabilità a posteriori di 0.99.

3.2 Studio della rigenerazione dal punto di vista istologico.

3.2.1 Istologia normale di *Chondrosia reniformis*.

L'istologia, **figura 2**, ha permesso di seguire durante tutte le fasi di ricellularizzazione nei fragmorph l'andamento del processo a livello cellulare, tenendo conto delle modificazioni che interessavano via via la matrice extracellulare collagenica. Le spugne utilizzate erano di dimensioni tali da permettere di ottenere tutti i fragmorph necessari ai diversi blocchi di esperimenti da un unico organismo per mantenere il più possibile l'uniformità delle risposte, **figura 2A**. L'istologia dei campioni non sottoposti a periodi di mantenimento in rigenerazione è stata di volta in volta testata con metodiche istologiche standard, poi utilizzate sui fragmorph dopo rigenerazione o trattamenti sperimentali. Nella **figura 2** mostriamo la situazione istologica normale, in **B e C** è possibile osservare alcuni dei principali tipi cellulari identificabili mediante colorazione con blu di toluidina su sezioni semifini in resina. Sono riconoscibili gli esopinacociti (ExP), sottili, che ricoprono lo strato superficiale dell'esopinacoderma (EPinD). In prossimità dello strato di esopinacociti e più all'interno nel mesoilo si osservano le cellule sferulose, (SpC), caratterizzate dai granuli, di un intenso blu viola o di un blu più pallido, con il nucleo spostato asimmetricamente, che poi si ritrovano anche più internamente frammiste alle camere coanocitarie (CC). Vicino a queste, a loro volta ben delimitate dai coanociti (indicati con una testa di freccia), è possibile osservare, più grandi, delle cellule che abbiamo identificato come archeociti (ArC). Sottili lofociti (LpC) si possono riconoscere immersi nella matrice, o più superficiali. La matrice collagenica in sezioni

sottili appare azzurrina e uniformemente distribuita. Nel coanosoma è possibile osservare la puntinatura determinata dalla presenza di numerosissimi batteri di varie dimensioni che vanno a costituire la popolazione normale della spugna. I lofociti e le cellule sferulose sono osservabili chiaramente in **D**, grazie alla microscopia TEM. Nel lofocita si nota immediatamente un nucleolo ben evidente circondato da eucromatina poco condensata, a testimonianza dell'attività sintetica della cellula. Il citoplasma risulta ricco di batteri, considerati simbionti da diversi autori, RER e Golgi strettamente impacchettati in prossimità del nucleo stesso la zona posteriore caratterizzata dalla presenza di collagene neosintetizzato e un sottile prolungamento. Al polo anteriore si vede parte di uno dei numerosi pseudopodi tipici del tipo cellulare che ne permettono il movimento nella matrice. (Bergquist, in Sponges, 1979). La cellula sferulosa in prossimità permette di osservare i due tipi di granuli presenti, di grandi dimensioni e poco elettrondenso e più piccolo molto più elettrondenso corrispondenti rispettivamente ai granuli meno e più colorabili con la toluidina. Nelle immagini successive di **figura 2 (E-H)** è possibile osservare la distribuzione del collagene fibrillare in sezioni in paraffina, rivelato con il metodo tricromatico di Masson, dove il citoplasma delle cellule assume diverse intensità di rosso arancio, i nuclei sono contrastati in nero dall'ematossilina ferrica, mentre le fibre di collagene appaiono azzurre. Le immagini sono state acquisite utilizzando il filtro DIC grazie al quale le cellule appaiono artificialmente in "rilievo" e si possono meglio apprezzare. E' evidente come nella spugna la normale distribuzione del collagene risulti essere uniforme nel mesoilo e scarsa nel

coanosoma dove le camere coanocitarie sono addossate fra di loro. Il collagene si ritrova più concentrato in prossimità dei canali dove appare anche orientato in senso radiale rispetto al lume dei canali.

Nei canali si possono osservare chiaramente anche i flagelli dei coanociti evidenziati dalla combinazione di colorazione e contrasto DIC. A fianco delle quattro immagini abbiamo aggiunto altrettanti cartoon che sono di aiuto per l'osservazione della disposizione della componente cellulare.

I lofociti appaiono chiaramente disposti parallelamente all'andamento delle fibre di collagene, specialmente dove questo è più denso, gli endopinacociti vanno a costituire uno strato continuo a delimitare il lume e proprio verso il canale sono localizzate molte cellule sferulose, che prendono anche direttamente contatto con gli endopinacociti.

Lo strato basale delle spugne, quello a contatto con il substrato, è simile come aspetto al mesoilo, e vede nel suo limite esterno la presenza di esopinacociti che per la posizione possiamo considerare basopinacociti (BsP). Interessante è osservare che sia nel mesoilo che nella porzione basale risultano presenti minuscoli granelli di materiale traslucido che sappiamo essere prevalentemente granelli silicei cristallini (g) che la spugna attivamente e selettivamente ingloba e demolisce con un'attività che appare essere cellulosa-mediata (Bavestrello et al., 1995, 1996, 1998a, b; Pozzolini et al., 2016, 2014).

3.2.2 Osservazioni SEM della superficie in rigenerazione di *C. reniformis*.

In **figura 3A** si possono osservare gli stadi attraversati in sequenza da un fragmorph durante il suo periodo di recupero. I carotaggi del calibro di 9 mm mostrano un ripiegamento del mesoilo, dello strato corticale, cortex, facilmente riconoscibile dal colore più scuro, tutto intorno al bordo superiore del taglio, verso il lato scoperto. Lo stesso tende a fare lo strato basale, probabilmente frenato dalla presenza di una massa di collagene compatta. Tutto il fragmorph inoltre, tende ad assumere una forma a botte, diminuendo in altezza, aumentando leggermente le sue dimensioni in senso perpendicolare al taglio, con combinazioni di intervalli di tempo come indicato di seguito: da 3 ore a 144 ore.

Previa fissazione in glutaraldeide e paraformaldeide e trattamento con tetrossido di osmio, sono state considerate per l'osservazione al SEM tre regioni dei fragmorph: superiore, inferiore e laterale, quest'ultima considerata quella di maggiore interesse.

Nella **figura 3** è mostrata la zona laterale. In **B** al tempo 0, immediatamente dopo il carotaggio, osservando il lato che espone le zone interne della spugna non è possibile riconoscere nessuna cellula e anche le fibre di collagene si mostrano amorfe, non individuabili, testimoniando i danni inflitti dal carotatore che pur essendo affilato e fatto passare una volta sola nella spugna, di fatto determina un danno imponente. In **C** al tempo 24h si inizia a poter osservare chiaramente del collagene fibrillare integro, (asterischi) e, in mezzo a uno strato di materiale granuloso di frammenti di cellule, probabilmente residui pre-carotaggio. Su tutta la superficie si nota la presenza di numerose strutture sferiche che per la loro forma e

dimensione potrebbero essere anche sferule degranulate dalle cellule sferulose che hanno raggiunto la superficie. E' ancora visibile materiale incoerente residuo del taglio. Nell'immagine **D** al tempo 48 ore è chiaramente osservabile la matrice collagenica, (asterisco), e che sembra emergere intatta al di sotto dei resti di uno strato incoerente. Non si osserva ancora nessun tentativo di ricellularizzazione. Alle 72 ore, **E**, invece la situazione cambia drasticamente, mentre lo strato di collagene adesso è chiaramente visibile e sgombrato di detriti, si vedono chiaramente gli esopinacociti che ricoprono la superficie esterna della spugna. I bordi delle cellule risultano chiaramente visibili. Osservando a basso ingrandimento è possibile stimare una ricopertura di circa la metà della superficie totale. Nelle zone in cui le cellule sono parzialmente distaccate o ribaltate è possibile osservare che queste prendono stretto contatto con le fibre della matrice sottostante. Le cellule appaiono aver raggiunto la superficie in più punti e poi essere giunte a coalescenza. Sono osservabili solamente sferule di piccole dimensioni concentrate sulla superficie. Si notano delle strutture allungate che potrebbero essere compatibili con batteri a catenella ma di cui non si è potuta indicare chiaramente l'identità. Nell'immagine in **F** a 144 ore i nuovi esopinacociti sono andati a ricoprire quasi completamente la superficie. Si può notare come le cellule appaiano in diversi punti ricoperte dalle fibre collagene dal quale stanno emergendo. Sono sempre bene visibili le sferule e il materiale arrangiato a catenelle. In **G**, in un particolare del tempo 72 ore si osservano le fibre di collagene attaccate alla faccia interna degli esopinacociti.

3.2.3 Utilizzo del metodo Indian Ink per indagare il ruolo dei coanociti nella rigenerazione dei fragmorph in *C. reniformis*.

L'utilizzo di **Indian Ink** ha permesso di seguire il destino dei coanociti dal momento in cui il fragmorph iniziava la rigenerazione. Nella **figura 4** le immagini della sequenza **A, C, E, G, I, H** mostrano porzioni di coanoderma rispettivamente ai tempi: 0, 24, 48, 72, 120, 144 ore. I coanociti marcati dall'ingestione del nerofumo delineano le camere coanocitarie e non se ne ritrovano a migrare all'interno della matrice del coanosoma/mesoilo per poi impegnarsi in un processo di differenziamento. Le cellule sferulose non hanno segni di marcatura, cosa che avrebbe reso difficoltosa l'osservazione del destino dei coanociti. Nelle immagini **B, D, F, H, J, L**, è invece possibile osservare il bordo esterno. Escludendo le situazioni in cui il taglio passa per parte del coanoderma o comunque in corrispondenza di camere coanocitarie, non si osservano cellule marcate spostarsi verso. Contestualmente alle osservazioni meramente morfologiche si è proceduto innanzitutto a seguire le variazioni eventuali di espressione delle molecole di interesse legate al mantenimento della staminalità e dell'omeostasi cellulare.

3.3 Studio della rigenerazione dal punto di vista molecolare.

3.3.1 Espressione basale dei TGF (1-6) e dei recettori TGFR (1, 2) identificati.

Nella **figura 5** sono riportati i dati relativi all'espressione dei diversi geni considerati TGF da 1 a 6 e TGFR1 e TGFR2. La trascrizione inversa (RT) unita alla reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnologia efficace per amplificare e rilevare

tracce di mRNA (Heid et al., 1996; Lockey, 1998). La “quantificazione relativa” misura il cambiamento relativo nell’espressione di mRNA di un gene su più campioni e lo esprime relativamente ai livelli di un altro mRNA. Il procedimento non richiede una curva di calibrazione o standard di concentrazioni note e come traccia di riferimento usa una trascrizione qualsiasi, purché con sequenza conosciuta (Bustin, 2002). Non importa l’unità di misura con cui viene espresso il processo e le quantità possono essere confrontate con più esperimenti di RT-PCR in tempo reale (Orlando et al., 1998; Vandesompele et al., 2002; Hellemans et al., 2006). Risultati di buona qualità richiedono una normalizzazione appropriata per garantire prestazioni identiche durante la rtPCR e verificare l'errore sperimentale (Vandesompele et al., 2002; Pfaffl et al., 2004), come quello introdotto nei vari processi di estrazione ed elaborazione dell'RNA, prima, e nella rtPCR stessa poi. I confronti relativi sono eseguiti mantenendo tutti i parametri il più costanti possibili, ad esempio per quanto riguarda la quantità di mRNA estratto, la massa di tessuto analizzata e così via (Skern et al., 2005). La scelta di geni housekeeping adeguati è però critica. Tra le tante possibilità si utilizzano le espressioni di geni di riferimento interni da comparare a quella dei geni di interesse, ad es. per β -actina o GAPDH (Dirnhofer et al., 1995; Ercodani et al., 1988). Per determinare i livelli di espressione dei geni di interesse si misurano le differenze (Δ) tra i cicli di threshold (Ct) e i crossing points (Cp) (Morse et al., 2005; Livak e Schmittgen, 2001). Si è provveduto a normalizzare i risultati sull’espressione di TGF4 posto come uguale a 1 essendo il gene meno espresso rispetto a tutti gli altri, in considerazione del fatto che più il ciclo soglia è alto e più

la quantità di mRNA presente è bassa. Si osserva come TGF4 e 5 sono i meno espressi rispetto a tutti gli altri. Per quanto riguarda i recettori indicati rispettivamente con TGFR1 e 2 il primo risulta espresso con un rapporto di quasi 5 volte ad 1 rispetto al secondo, in condizioni normali. Giacché la spugna è un animale in costante rigenerazione, questi valori relativi di espressione fanno pensare che TGF1-2-3-6, altamente espressi possano essere legati ai fenomeni di proliferazione e di mantenimento di staminalità, mentre TGF4-5 potrebbe essere più legati a fenomeni di differenziamento che si attivano in momenti specifici.

3.3.2 Espressione TGF (1-6) e TGFR durante il processo di rigenerazione.

Nella **figura 6** è riportato un profilo di espressione dei diversi TGF osservati durante la rigenerazione. L'espressione di TGF1, e 2 rimane costante ed invariata per tutti i tempi di osservazione, tranne osservare un calo significativo dell'espressione solo di TGF1 alle 144 ore. Anche l'espressione di TGF3 rimane invariata per le prime 24 ore, per poi subire un calo significativo di espressione che viene mantenuto dalle 48 ore fino al tempo massimo di osservazione di 144 ore. TGF4 e 5 mostrano, validando l'ipotesi fatta osservando l'espressione basale nella spugna normale, una variazione diversa come profilo ma significativa: TGF4 non varia fino a 72 ore dove mostra un aumento significativo che viene mantenuto fino alle 144 ore, con la maggiore variazione osservabile all'interno del gruppo, mentre TGF5 sin dai primi momenti della rigenerazione e per tutto il tempo osservato mostra un aumento significativo del suo livello di espressione rispetto al tempo 0. Infine, l'espressione del TGF6 dopo

essere significativamente aumentata dalle 3 ore fino alle 24 ore rispetto al tempo 0, subisce una drastica diminuzione fino al tempo massimo di osservazione di 144 ore. Per quanto riguarda i due TGFR, 1 e 2, solo il TGFR1 aumenta significativamente la propria espressione al tempo 9 ore rispetto al tempo 0 per poi scendere significativamente a tutti i tempi successivi, mentre il TGFR2 diminuisce la sua espressione significativamente dalle 24 ore in poi.

3.3.3 Espressione di PIWI, Musashi e Bcl2, marcatori di staminalità/proliferazione, in *C. reniformis* in rigenerazione.

Nella **figura 7** si può osservare come nell'arco delle 144 ore dal taglio l'espressione di PIWI rimanga statisticamente invariata, costante. L'espressione di Msi, al contrario, mostra importanti variazioni, statisticamente significative, con un rapido e deciso aumento di circa il doppio fino al tempo 24 ore ed una successiva drastica caduta a livelli più bassi rispetto a quelli presenti al tempo 0 fino al tempo di osservazione più lungo considerato, le 144 ore. Per quanto riguarda l'espressione di Bcl-2 il trend osservato descrive una graduale diminuzione che porta a più che un dimezzamento, statisticamente significativo, nell'arco delle 144 ore.

3.3.4 Espressione di collagene fibrillare, collagene non fibrillare, P4H (prolil 4 idrossilasi), e sintesi di tropocollagene, in *C. reniformis* in rigenerazione.

Nella **figura 8** sono riportati i dati relativi all'espressione del collagene fibrillare, del collagene non fibrillare e dell'enzima P4H. I dati mostrano una leggera ma

significativa diminuzione dell'espressione genica di entrambi collageni (Fig. 8A e B) per la maggior parte dei tempi di osservazione, mentre per quanto riguarda l'enzima P4H, i suoi livelli rimangono per lo più invariati tranne registrare una diminuzione alle 3 ore e alle 144 ore di osservazione. La quantificazione tramite dosaggio al SIRCOL della deposizione del tropocollagene di neosintesi (Fig. 8C) nei fragmorph in rigenerazione mostra anch'essa una graduale ma significativa diminuzione verso le 144 ore.

3.3.5 Immunofluorescenze per Musashi in *C. reniformis* in rigenerazione.

Una volta ipotizzato il coinvolgimento di Musashi nel processo di rigenerazione ed acquisito un anticorpo anti-Musashi si sono eseguite una serie di immunofluorescenze volte a localizzare possibilmente le cellule produttrici. Il protocollo è stato messo a punto escludendo l'utilizzo di sezioni in paraffina che avevano prodotto un segnale non pulito e utilizzando esclusivamente campioni sezionati criostaticamente. In **figura 9** è possibile osservare la zona del coanoderma **A, C, E, G** e la zona adiacente al taglio **B, D, F, H** rispettivamente a 4 tempi, 0, 24, 72 e 144 ore. Sono risultate chiaramente ed esclusivamente positive solamente le cellule appartenenti ad un unico tipo cellulare, uniforme come forma, dimensione e posizione. Si tratta di cellule con nucleo ben evidente, tondeggianti, con un diametro di circa 15 micron, caratterizzate da un'intensa fluorescenza interessante tutto il citoplasma e non solo il nucleo. Si trovano principalmente localizzate nel coanoderma dove sembrano risiedere in prossimità delle camere coanocitarie. In

base ai dati di letteratura possiamo identificarle con gli archeociti di *C. reniformis*. A partire dalle 72 ore e fino alle 144 ore si osserva un aumento della presenza di archeociti positivi per Musashi nella zona di taglio lontana dal coanoderma. Al contempo non varia la presenza di archeociti nelle zone del coanoderma.

3.3.6 Risultati della ISH.

I risultati delle ISH sono riassunti in **figura 10** dove in 1A, B e C è mostrata l'espressione della proteina TGF β simile, scelta come sonda e corrispondente all'isotig 12606, in sezioni criostatiche rispettivamente ai tempi di rigenerazione 0, 24 e 72 ore. Il controllo negativo al tempo 0 è mostrato in 1C. E' stato osservato un segnale intensamente positivo localizzato solamente nei coanociti delle camere coanocitarie, a tutti e tre i tempi presi in considerazione, senza che la positività fosse rilevabile in altri tipi cellulari o comunque in cellule al di fuori delle camere stesse. In precedenza era stata effettuata la messa a punto del protocollo ISH utilizzando come sonda il collagene fibrillare. In questo caso ci si aspettava che il segnale fosse localizzato a livello dei soli lofociti, in quanto è ampiamente dimostrato che sono la sede di sintesi. Confermando i dati in letteratura, anche nel nostro studio, l'unico tipo cellulare che ha mostrato una marcatura con la sonda del il collagene fibrillare di *C. reniformis* sono stati i lofociti, dimostrando che la metodica metodica ISH messa a punto fosse adeguata anche per *C. reniformis*. Inoltre in queste cellule è anche stata osservata (con marcatura fluorescente) una loro affinità per la lectina WGA

che di fatto risultava colocalizzata con le cellule positive per il collagene fibrillare mediante ISH (figura 10F).

3.3.7 Comparazione microscopica della rigenerazione in fragmorph normali e trattati con inibitori LDN-212854 e SB-431542.

I risultati della comparazione tra la rigenerazione osservata istologicamente e comparata tra i fragmorph di controllo e quelli trattati con due inibitori della via di segnalazione TGF/BMP sono riassunti nella tavola di figura 11. Nel **campione di controllo** le osservazioni SEM hanno mostrato lo stesso andamento osservato in precedenza, confermando i tempi e le modalità di ripristino dello strato esopinacocitario: in figura 10 A, D e G rispettivamente ai tempi 24, 72 e 144 ore, si può osservare come sulla spugna il collagene che risulta esposto dall'operazione di taglio, è ancora libero ed ha le fibre compattate fra di loro; successivamente nelle immagini ottenute alle 72 ore, mentre la superficie della spugna esposta si ricopre in parte di materiale incoerente mostra nel contempo nelle zone libere la matrice con le fibre collagene visibilmente più lasse e meno compattate; infine al raggiungimento delle 144 ore la spugna si ritrova ad essere quasi completamente ricoperta di esopinacociti e nei punti dove questi mostrano ancora parte della matrice sottostante il collagene si mostra ancora lasso. E' possibile apprezzare la stessa situazione osservando le immagini in figura 10J e M dove si osserva in sezione sagittale la superficie della spugna in rigenerazione in sezioni in paraffina colorate rispettivamente con Tricromica di Masson, ed osservate in DIC, e Sirius Red,

osservate con filtro polarizzatore. In J si nota come lo strato esopinacocitario appaia oramai integro e nella parte superiore del mesoilo la popolazione cellulare che si riscontra solitamente in condizioni normali appaia completamente ricostituita, almeno come numerosità, con molte cellule sferulose affastellate in prossimità dell'ectosoma. La matrice di collagene, intensamente colorata di blu dove i fasci sono più grandi e fitti, non mostra segni di scompattamento. Anche con il Sirius Red il collagene appare normale e ricco di fasci di fibre di grosso calibro strettamente legate fra di loro tipiche della struttura del mesoilo di *C. reniformis*.

L'utilizzo dell'inibitore LDN-212854, potente inibitore dei recettori TGF, ha mostrato un intenso effetto biologico nei confronti del processo di rigenerazione dei fragmorph della spugna nelle condizioni sperimentali testate. In figura 10B, E e H rispettivamente ai tempi 24, 72 e 144 ore, si può osservare come a 24 ore il collagene che risulta esposto dall'operazione di taglio, non appare più ancora libero come accade nel controllo 3A e le fibre che risultano visibili sotto al materiale incoerente mostrano una trama deteriorata; successivamente alle 72 ore, la superficie della spugna risulta completamente ricoperta di materiale compattato che non permette di apprezzare la trama di fibre collagene sottostanti, mentre nei controlli allo stesso tempo le fibre erano ben visibili ed esposte all'acqua esterna.

Infine alle 144 ore, quando nei controlli la spugna si ritrova ad essere quasi completamente ricoperta di esopinacociti con poco collagene ancora visibile, nel trattato con LDN-212854 non si osserva nessun esopinacocita in superficie o in

procinto di fuoriuscirci, e il collagene completamente esposto è compattato o solamente in pochi punti mostra la trama normale.

In figura 10K mediante Tricromica di Masson si osserva una drastica rarefazione della componente collagenica in tutto il mesoilo e con il Sirius Red è possibile apprezzare l'assottigliamento delle fibre presenti, chiaramente visibili in verde/giallo, pur conservando la tipica trama intrecciata.

L'utilizzo di SB-431542, ha mostrato un effetto biologico avverso nei confronti del processo di rigenerazione e ha impedito la sopravvivenza ai fragmorph nei recuperi successivi alle 144 ore nelle condizioni sperimentali testate.

In figura 10C, a 24 ore il collagene esposto mostra intensa degradazione, la trama non è più riconoscibile e l'integrità della struttura nei confronti dell'ambiente esterno risulta essere compromessa.

Successivamente si osservano ancora residui cellulari e materiale incoerente fino alle 144 ore. L'istologia in luce mostra la degradazione del collagene e la sua riduzione ad una serie di fasci di medio calibro slegati oramai gli uni dagli altri.

3.3.8 Espressione di Musashi, Bcl2 e geni procollagenici in risposta all'inibitore LDN-212854.

I fragmorph in rigenerazione sono stati esposti all'inibitore LND-212854, e se ne è ottenuto il profilo di espressione dal tempo 0 al tempo 72 e 144 ore rispetto al controllo non trattato, **figura 12**. Il profilo di espressione tipico di Musashi, in particolare, risulta significativamente aumentato solo alle 24 ore (circa il 2.2 volte)

in presenza di inibitore rispetto al controllo. I geni per i collagene fibrillare e non fibrillare mostrano anch'essi un aumento significativo alle 24 ore (circa 2.1 volte per il collagene fibrillare e di 1.4 volte per il non fibrillare) per poi tornare ai livelli del controllo nelle ore successive. I geni per l'enzima di modificazione del collagene P4H e la proteina antiapoptotica Bcl2 rimangono invariati rispetto al controllo per tutti e tre i tempi di osservazione.

4 DISCUSSIONE

Obiettivo del lavoro è stato stabilire il ruolo di membri della famiglia TGF β nella rigenerazione tissutale e nella deposizione di matrice extracellulare della demospongia *C. reniformis*, di cui si era già in possesso del trascrittoma, dato che le proteine della famiglia del TGF sono considerate tra le molecole più implicate in questi processi negli organismi superiori, studiandone il profilo di espressione durante la rigenerazione e affiancandoci lo studio microscopico degli eventi a livello cellulare nel modello dei fragmorph. Come primo passo è stata effettuata una ricerca per trascritti per identificare i membri della superfamiglia dei TGF β , al fine di trovare nel trascrittoma di *C. reniformis* sequenze omologhe a questi fattori di crescita. L'analisi di sequenze TGF-simili ha permesso di identificare nel trascrittoma alcuni membri della famiglia dei TGF. Sono risultate presenti sei sequenze e altre due relative ai recettori. Delle prime, tre sono risultate essere complete anche del peptide segnale, TGF1, 2 e 3, mentre le altre tre ne sono prive (Fig. 1D). Si nota come predomini il numero dei ligandi rispetto a quello dei recettori, probabilmente perché nell'evoluzione è maggiore il livello di conservazione delle sequenze proteiche nel comparto intracellulare rispetto alle sequenze proteiche riversate all'esterno della cellula, quindi i recettori tenderebbero a variare meno sia come numero che come sequenze rispetto ai loro ligandi che sembrerebbero più liberi di mutare durante il processo evolutivo. Questo comportamento in effetti era già stato osservato proprio in *C. reniformis* in Pozzolini et al., (2016a) nell'identificazione di

sequenze TNF-like e dei putativi recettori di tali citochine, dove si era osservato un simile rapporto ligandi/recettori.

La successiva analisi filogenetica dei domini peptidici di TGF β confrontati con quelli di *M. leidy* (Pang et al., 2011), ha mostrato un posizionamento piuttosto indefinito dell'unico ligando omologo alla demospongia *Amphimedon queenslandica* (Aqu), utilizzato in questo lavoro, che non risultava essere chiaramente raggruppato in cluster delle BMP o dei TGF β . Anche con la nostra l'aggiunta di ulteriori omologhi presenti in altre specie di poriferi, dei quali esistevano i trascrittomi già assemblati e accessibili, e presi in considerazione per l'analisi bayesiana effettuata, non è stato possibile fornire una netta classificazione tra i membri della superfamiglia del TGF. Alcune sequenze, come ad esempio isotig04814_p1 e isotig04815_p1 da *C. reniformis*, Hca_comp166946_c0_seq4_p1 da *H.cerulea* e Cnu_12673_p1 da *C. nucula*, clusterizzano con la sequenza Aqu, presente nell'analisi originale di Pang et al., con un valore di probabilità posteriore piuttosto basso di 0,79, anche se con posizionamento non chiaro.

Nel complesso la topologia ad albero che abbiamo ottenuto ci suggerisce che la divisione della superfamiglia TGF nei due cladi TGF β \Bmp, come viene mostrato da Pang et al., (cit) abbia avuto luogo dopo o indipendentemente dai Porifera, perché i trascritti delle spugne non si inseriscono in nessuno dei due raggruppamenti. Inoltre, possiamo ipotizzare che da un gene ancestrale anche in questo phylum possano essersi generati vari paraloghi, in grado di svolgere quindi funzioni diverse. Una eccezione riguarda le sequenze di della spugna *Homoscleoromorpha Corticium*

candelabrum, con uno dei suoi trascritti che si va effettivamente a raggruppare nel clade dei TGF β . Questo comportamento, che in questa spugna dimostra una chiara appartenenza del trascritto al clade dei TGF può essere legato alla posizione evolutiva delle Homoscleoromorpha, attualmente considerata la classe più evoluta di Porifera, su di una robusta base morfologica, essendo l'unico gruppo di spugne a possedere una vera membrana basale, e quindi un primo vero tessuto animale. Quindi tra tutte le spugne, solo per le Homoscleromorpha siamo in grado di stabilire l'appartenenza dei suoi trascritti TGF ad un clade specifico (quello dei TGF β e non delle BMP) mentre per le altre spugne, meno evolute non si è in grado di farlo.

Per quanto riguarda l'espressione dei trascritti TGF/TGFr che sono stati individuati dalla ricerca in silico sul trascrittoma, i loro livelli nella spugna non in rigenerazione sono risultati essere molto diversi fra di loro, alcuni con livelli basali di espressione particolarmente bassi come TGF4 e 5, altri con livelli basali di espressione molto alti rispetto a questi ultimi, come ad esempio TGF1, 2 e 3 e 6 che sono espressi dalle 50 alle 20 volte di più (Fig. 5). Al contrario, durante il processo di rigenerazione, osserviamo importanti variazioni di espressione con un aumento significativo, sia per TGF4 e 5 nelle ultime fasi della rigenerazione (da 24 a 72 a 144 ore) mentre per TGF6 osserviamo un significativo aumento sostanzialmente solo nelle prime 24 ore. Tutti gli altri trascritti non variano durante la rigenerazione (TGF2) o addirittura vengono downregolati (TGF1 e 3). Queste fluttuazioni fanno pensare ad un coinvolgimento dei tre geni upregolati nei processi di rigenerazione in corso. I dati riguardanti l'espressione del collagene fibrillare e non fibrillare e della P4H (Fig. 8)

indicano una diminuzione della loro espressione e quindi una neosintesi di collagene che va diminuendo per tutto il periodo della rigenerazione, e si affiancano alle osservazioni microscopiche che mostrano un rimaneggiamento della componente fibrillare, collagenica, della matrice, che dopo essere divenuta più lassa ripristina la struttura normale alle 144 ore, ma senza che si possa osservare una neosintesi di collagene con metodi di microscopia. Questo potrebbe essere giustificato dal fatto che la spugna di per sé ha già una elevata espressione di collagene a livelli basali e nel momento della rigenerazione per questioni energetiche potrebbe doversi concentrare più sulla proliferazione e differenziamento cellulare che sulla deposizione di matrice extracellulare, da qui la diminuzione dei trascritti di collagene immediatamente dopo il taglio dei fragmorph. Per quanto riguarda l'espressione dei geni di staminalità Piwi e Musashi, mentre la presenza del primo è associata sia ai coanociti che agli archeociti, quella di Musashi è invece associata in modo esclusivo ai soli archeociti (immunofluorescenza in Fig. 9). Nella spugna in rigenerazione anche la loro espressione è molto diversa (Fig. 7): quella di PIWI non varia fino alle 144 ore dopo il taglio, mentre quella di Musashi mostra un aumento statisticamente significativo al tempo 9 e 24 ore rispetto al tempo 0, per poi scendere al di sotto del controllo dalle 48 fino alle 144 ore. Il differente comportamento di questi due geni sembrerebbe indicare che nel processo di rigenerazione sono principalmente implicati gli archeociti testimoniati dalla variazione di espressione di Musashi mentre sembrerebbero non essere implicati i coanociti in cui l'espressione di Piwi rimane costante per tutto il periodo della rigenerazione. In particolare la variazione

positiva di espressione di Musashi, può spiegarsi con una iniziale proliferazione degli archeociti nelle prime 24 ore dal taglio che giustificherebbe un aumento di espressione del gene di staminalità nel tessuto della spugna, per poi scendere sotto i livelli del controllo dalle 48 ore in poi, tempo in cui probabilmente comincia l'espressione di geni del differenziamento cellulare che portano alla formazione del nuovo strato di esopinacociti che deve rivestire nuovamente il coanoderma. Quindi potremmo dire che nel nostro modello di rigenerazione della spugna il processo sembra legato al differenziamento degli archeociti più che ad un transdifferenziamento dei coanociti, considerando che non vi è una loro attiva duplicazione cellulare osservabile almeno per tutto il periodo di tempo preso in considerazione, fino alle 144h (test BrDU fig.16) o una loro migrazione (test Indian Ink fig.4). Dato che Musashi, invece, appare implicato nel mantenimento della staminalità proprio negli archeociti i risultati indicherebbero una tendenza degli archeociti stessi a proliferare nelle prime ore dopo il danno alla spugna, seguito da una trasformazione degli stessi ad esopinacociti ed una loro migrazione successiva verso il coanoderma come è anche possibile osservare da un punto di vista microscopico durante il processo di rigenerazione (Fig 3).

Il protocollo per la ISH su *C. reniformis* è stato dapprima validato attraverso l'identificazione delle cellule positive al trascritto per il collagene fibrillare di *Chondrosia* ossia i lofociti (Fig. 10E), e la loro forma (Gaino cit), grazie al confronto con le immagini TEM e CLSM ha permesso la loro univoca attribuzione. Le stesse cellule sono inoltre risultate colorabili con la lectina WGA, e sui preparati di prova

per l'ISH è stato possibile sovrapporre la positività WGA al segnale ISH del trascritto di collagene (figura 10F), affrontando uno dei tipici problemi dello studio dei poriferi, ovvero l'attribuzione dei diversi tipi cellulari osservabili. Il protocollo ha poi permesso per la prima volta la localizzazione a livello cellulare del trascritto TGF6 omologo dei TGF β degli organismi superiori (figura 10A-D). Il trascritto è stato scelto per l'analisi in ISH poiché è risultato essere il gene con la maggiore variazione di espressione nella spugna in rigenerazione nelle prime 24 ore. Tale variazione ricalca in parallelo l'overespressione di Musashi allo stesso tempo di incubazione facendo pensare che TGF6 possa essere implicato nel mantenimento della staminalità degli archeociti e nella loro proliferazione con divisioni di tipo simmetrico (che non danno origine a differenziamenti cellulari). Per questo particolare gene è stato possibile osservarne la trascrizione ad opera di un solo tipo cellulare, i coanociti, quindi l'attività di TGF6, se fosse legata al mantenimento di staminalità degli archeociti, come i dati ci inducono a supporre, sarebbe nelle spugne un'attività di tipo paracrino. Il protocollo è adesso disponibile per poter proseguire le indagini a livello di espressione *in situ* delle diverse molecole analoghe di TGF di interesse. Anche se effettuata solamente con l'utilizzo di Ab commerciali l'identificazione della popolazione di Archeociti come Musashi positivi, la loro forma e posizione, il loro coinvolgimento nei processi osservati, questa marcatura potrà essere considerata nei futuri lavori di indagine su questo organismo e in generale sulle Demospongiae, anzi proprio la natura commerciale dell'Ab ne permetterà un utilizzo routinario come marcatore.

Considerati nel loro complesso i risultati ottenuti rafforzano l'ipotesi iniziale di un coinvolgimento di molecole TGF β nei processi che intervengono nel recupero da danno tissutale in *C. reniformis*, rappresentante delle Demospongiae. Il confronto con i dati di espressione permette di ipotizzare una rete di segnali complessa, in grado di modulare sia la migrazione di elementi staminali sia il loro differenziamento in esopinacociti e allo stesso tempo di intervenire nella regolazione della deposizione/riarrangiamento della matrice collagenica. Le osservazioni ripetute al SEM sui fragmorph hanno permesso di valutare come al tempo 144h la ricellularizzazione dello strato esopinacocitario in condizioni sperimentali si possa considerare in fase di completamento. In questo studio sono state quindi descritte le varie fasi del processo di rimarginazione, identificata una popolazione cellulare archeocitaria che appare attivamente coinvolta nel processo e indicati come possibili fattori di regolazione alcune molecole TGF-simili.

Al fine di cercare di dimostrare un nesso causale tra l'overespressione di alcuni TGF durante il processo di rigenerazione e i meccanismi di rigenerazione stessa sono stati utilizzati due inibitori della via di trasduzione del segnale TGF/BMP che agiscono principalmente sui recettori di questi fattori di crescita. Sono state acquisite immagini dei tempi da 0 a 144 ore nella zona che si è rivelata di maggiore interesse, la laterale esposta dal carotaggio. Affinando la fissazione è stato possibile valutare in modo più accurato lo stato della matrice collagenica e il livello di ricopertura cellulare e di integrità cellulare, sia nel controllo che nei campioni trattati con gli inibitori (figura 11). Nonostante la tossicità ai tempi lunghi dell'inibitore SB-431542

è stato comunque possibile acquisire immagini relative al suo effetto sia al SEM che istologicamente e a confrontarle sperimentalmente con gli effetti dell'inibitore LDN-212854. Risulta chiaro come i due inibitori interferiscano con il processo di rimarginazione cellulare e con lo stato di deposizione/riarrangiamento della matrice con una rarefazione delle fibre collagene e una inibizione della rigenerazione dello strato esopinacocitario anche sui tempi più lunghi osservati, 144 ore. Data l'elevata tossicità dell'inibitore SB-431542, i dati di espressione genica sono stati ottenuti solamente trattando i fragmorph con l'inibitore LDN-212854 e confrontandoli con i fragmorph di controllo. Lo studio dell'espressione di Musashi in fragmorph in rigenerazione esposti all'inibitore LDN-212854 hanno mostrato un aumento della sua espressione di più del doppio entro le 24 ore dal taglio e il suo rientro nella normalità entro le 72 ore indicando l'intervento di una via mediata da alcuni dei TGF nel controllo dell'espressione di Musashi. In particolare si potrebbe ipotizzare che l'inibitore agendo sui recettori TGF che guidano il differenziamento degli archeociti, inibendo tale processo, porti ad un aumento di espressione del gene di staminalità in queste cellule. Similmente anche l'espressione dei due collageni, fibrillare e non fibrillare, che durante il processo di rigenerazione tendono a diminuire di espressione, nei campioni trattati con l'inibitore del TGF subiscono un'overespressione alle 24 ore, a dimostrare che anche in questo caso, almeno alcuni dei TGF individuati in questo studio sono implicati nel controllo della deposizione della matrice extracellulare. Questi risultati rafforzano l'ipotesi iniziale di un coinvolgimento di molecole TGF β -simili nei processi che intervengono nel

recupero da danno tissutale nelle Demospongiae, purtroppo il limite di queste molecole inibitrici è che non ci permettono di stabilire quali dei vari TGF individuati vengono inibiti poiché questi inibitori non sono specifici per i vari ligandi dei recettori TGF β . Possiamo solamente fare delle ipotesi che si basano sull'andamento dell'espressione genica di questi trascritti durante il processo di rigenerazione. Verosimilmente i trascritti TGF 1, 2 e 3 che sono molto espressi nella spugna non in rigenerazione e non subiscono grandi variazioni durante la rigenerazione, sono implicati nel mantenimento dell'omeostasi tissutale dell'animale in condizioni basali, mentre il trascritto TGF6 che aumenta significativamente nelle prime 24 ore dal taglio contemporaneamente all'aumento di espressione di Musashi, potrebbe essere implicato nella proliferazione e mantenimento della staminalità degli archeociti. Infine i trascritti di TGF4 e 5 che aumentano significativamente nei tempi successivi alle 24 ore durante la rigenerazione, potrebbero essere quelli implicati nei processi più tardivi della rigenerazione che riguardano il differenziamento, la migrazione cellulare e il riarrangiamento della matrice cellulare.

5 CONCLUSIONI

5.1 Ultime considerazioni.

In conclusione, i dati ottenuti e le nostre osservazioni, nel caso di *Chondrosia reniformis*, indicherebbero proprio negli archeociti, identificabili come cellule Musashi positive, la fonte dei nuovi esopinacociti, almeno durante i fenomeni di rigenerazione come quelli presi in esame, senza escludere un intervento di coanociti in altre condizioni o in tempi più lunghi. Inoltre la via del TGF β , declinata in *C. reniformis* con diversi trascritti con diverse funzioni, sarebbe coinvolta nei processi di mantenimento della staminalità, del differenziamento cellulare, della migrazione cellulare e del rimodellamento della matrice collagenica. La via di segnalazione TGF si confermerebbe già precocemente attiva in un organismo, *C. reniformis*, appartenente al gruppo di organismi pluricellulari considerato filogeneticamente più antico, quali sono considerate le spugne. Le peculiarità di questa via di segnalazione in questi animali rispetto agli altri gruppi evolutivamente più recenti potrebbero essere dovute ad una evoluzione parallela di funzioni TGF-simili a partire da un gene ancestrale comune che si è distaccato nelle spugne più antiche (Demospongiae) seguendo un percorso proprio. Questo comportamento si distingue da quello delle spugne Homoscleromorpha, ritenute attualmente come il più probabile gruppo alla base degli Eumetazoa, in cui invece è possibile clusterizzare i trascritti TGF-simili come già appartenenti al clade TGF degli organismi superiori.

5.2 Schema riassuntivo finale.

Nello schema di **figura 13** vogliamo riassumere le nostre conclusioni e proponiamo una *stadiazione del processo di recupero cellulare* in forza dei dati molecolari e morfologici esposti. Tutto il processo di rigenerazione si articolerebbe in tre stadi.

Stadio 1 - Nel fragmorph in rigenerazione, mentre lo stesso va incontro ad una modificazione fisica, quale l'assunzione di una forma a botte per cercare di minimizzare il danno subito riducendo la superficie esposta, vedrebbe un aumento dell'espressione di TGF5 e TGF6, insieme ad un aumento dell'espressione di Musashi, da parte degli archeociti. Questa situazione iniziale dura circa 24 ore e viene indicata appunto come Stadio1.

Stadio 2- Mentre continua la deformazione del fragmorph, TGF5 continua ad essere overespresso ma in compenso diminuiscono nettamente il TGF3 e 6. Abbiamo definito questo lo Stadio 2, durante il quale gli archeociti iniziano a differenziarsi e a muoversi verso la zona di taglio.

Stadio 3 – In questo Stadio 3, TGF5 continua ad essere altamente espresso come anche TGF4, contemporaneamente al calo di TGF1 3 e 6. A questo punto gli archeociti continuano a raggiungere la periferia e gli esopinacociti, di derivazione archeocitaria, hanno quasi ricoperto tutta la superficie esterna ricostituendo definitivamente lo strato epiteliale protettivo.

6 BIBLIOGRAFIA

Adamska M, Degnan SM, Green KM, Adamski M, Craigie A, Larroux C, Degnan BM (2007) Wnt and TGF- β Expression in the Sponge *Amphimedon queenslandica* and the Origin of Metazoan Embryonic Patterning. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001031> PLOSOne

Alberts B, Johnson A, Lewis J (2016) Biologia molecolare della cellula. Sesta Ed.

Alexander BE, Achlatis M, Osinga R, van der Geest HG, Cleutjens JPM, Schutte B, de Goeij JM (2015) Cell kinetics during regeneration in the sponge *Halisarca caerulea*: how local is the response to tissue damage? PeerJ 3:e820

Alexander V. Ereskovsky - The Comparative Embryology of Sponges. Springer 2010

Aloe L (2004) Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. Trends Cell Biol 14:395-9

Anjum K, Abbas SQ, Shah SAA, Akhter N, Batool S, Hassan SS (2016) Marine Sponges as a Drug Treasure. Review Biomol Ther 24:347-362

Arthur A, Zannettino A, Gronthos S (2009) The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. J Cell Physiol 218: 237-245

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Rep Reg 16:585-601

Bavestrello G, Benatti U, Calcinai B, Cattaneo-Vietti R, Cerrano C, Favre A, Giovine M, Sara M (1998a) Body polarity and mineral selectivity in the demosponge *Chondrosia reniformis*. Biol Bull 195:120-125

Bavestrello G, Arillo A, Calcinai B, Cerrano C, Lanza S, Sara M, Cattaneo-Vietti R (1998b) Siliceous particles incorporation in *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae). Ital J Zool 65:343-348

Bavestrello G, Cerrano C, Cattaneo-Vietti R, Sarà M, Calabria F, Cortesogno L (1996) Selective incorporation of foreign material in *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae). Ital J Zool 63:215-220

Bavestrello G, Arillo A, Benatti U, Cerrano C, Cattaneo-Vietti R, Cortesognoi L, Gaggero M, Giovine M, Tonetti M, Sarà M (1995) Quartz dissolution by the sponge *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae) Nature 378:374-376

- Beate M Slaby, Thomas Hackl, Hannes Horn, Kristina Bayer & Ute Hentschel (2017) Metagenomic binning of a marine sponge microbiome reveals unity in defense but metabolic specialization. *The ISME Journal* 11:2465–2478
- Borchiellini C, Manuel M, Alivon E, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y (2001) Sponge paraphyly and the origin of Metazoa, *Journal of Evolutionary Biology* 14:171–179
- Boury-Esnault N, Lavrov D, Ruiz César A., Pérez, T (2014) The integrative taxonomic approach applied to porifera: a case study of the homoscleromorpha *Integrative and Comparative Biology* 53:416-427
- Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A (2011) Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* 23:609-620
- Burt DW, Law AS (1994) Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res* 5:99–118
- Cerrano C, Calcinai B, Di Camillo CG, Valisano L, Bavestrello G (2007) How and why do sponges incorporate foreign material? Strategies in Porifera. In *Porifera Research: Biodiversity, Innovation & Sustainability, Serie Livros 28* (ed. MR Custodio, E Hajdu, G Lobo-Hajdu e G Muricy) pp 239-246
- Chang SC, Hoang B, Thomas JT, Vukicevic S, Luyten FP, Ryba NJ, Kozak CA, Reddi AH, Moos M (1994) Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem* 269:28227-28234
- Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004) Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22:233-241
- Del Rosario C, Rodríguez-Évora M, Reyes R, Delgado A, Évora C (2015) BMP-2, PDGF-BB, and bone marrow mesenchymal cells in a macroporous β -TCP scaffold for critical-size bone defect repair in rats. *Biomed Mater* 10:045008
- Ducy P, Karsenty G (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57:2207-2214
- Ereskovsky AV, Borisenko IE, Lapébie P, Gazave E, Tokina DB, Borchiellini C (2015) *Oscarella lobularis* (Homoscleromorpha, Porifera) Regeneration: Epithelial Morphogenesis and Metaplasia. *PLoS One*. 10(8):e0134566

- Estes BT, Wu AW, Guilak F (2006) Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum* 54:1222-1232
- Fiore M, Chaldakov GN, Aloe L (2009) Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems. *Rev Neurosci* 20:133-45
- (Morfin e Thouvenot D, 2003) Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol*, 26:29-37.
- Funayama N, Nakatsukasa M, Mohri K, Masuda Y, Agata K (2010) Piwi expression in archeocytes and choanocytes in demosponges: insights into the stem cell system in demosponges. *Evol Dev* 12:275-87
- Funayama N. Stem Cell System of Sponge (2008) In book: *Stem Cells* p17-35
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024152>
- Fusetani N, Matsunaga S (1993) Bioactive sponge peptides. *Chemical Reviews* 93:1793-1806
- Gaino Elda (2011) Overview of Porifera. Pages 1-53. In: Pansini M, Manconi R, Pronzato R. *Fauna d'Italia. Vol. XLVI Porifera I. R. Editors. Calderini Edizioni, Bologna*
- Garrone R, Huc A, Junqua S (1975) Fine structure and physicochemical studies on the collagen of the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo. *J of Ultrastr Res* 52:261-275
- Gazave E, Lapébie P, Ereskovsky AV, Vacelet J, Renard E, Cardenas P, Borchiellini C (2012) No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. *Hydrobiologia* 687:3–10
- Giovine M, Scarfi S, Pozzolini M, Penna A, Cerrano C (2013) Cell reactivity to different silica. *Prog Mol Subcell Biol* 54:143-74
- Giovine M, Pozzolini M, Fenoglio I, Scarfi S, Ghiazza M, Benatti U, Fubini B (2002) Crystalline silica incubated in ascorbic acid acquires a higher cytotoxic potential. *Toxicol Ind Health* 18:249-255
- Hamburger V (1993) History of Growth Factor discovery related studies. The history of the discovery of the nerve growth factor. *J Neurobiol* 24:893-7
- Herpin A, Lelong C, Favrel P (2004) Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* 28:461–85

Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62:65-74

Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M (2006) Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 39:678-683

Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C, Martin W, Fornwald J, Lehr R, Harling J, Gaster L, Callahan JF, Olson BA (2002) Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* 62:58-64

Ledda FD, Ramoino P, Ravera S, Perino E, Bianchini P, Diaspro A, Gallus L, Pronzato R, Manconi R (2013) *Aquat Toxicol*. Tubulin posttranslational modifications induced by cadmium in the sponge *Clathrina clathrus*. 140-141:98-105

Lee WL, Reiswig HM, Austin, WC, Lundsten, L (2012) An extraordinary new carnivorous sponge, *Chondrocladia lyra*, in the new subgenus *Symmetrocladia* (Demospongiae, Cladorhizidae), from off of northern California, USA. in *Invertebr Biol* vol 131 pp 259–284

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology *Cell* 104:487–501

Majumdar MK, Wang E, Morris EA (2001) BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 189:275-284

Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M (2010) Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147:35-51

Moustakas A, Heldin CH (2005) Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118: 3573-3584

Müller Sponges (Porifera). *Marine Molecular Biotechnology*. pag 157. Editors: Müller WEG Springer, Berlin, 2003

Nardo G (1847) Osservazioni anatomiche sopra l'animale marino volgarmente detto Rognone di Mare. Adunanza del 29 Marzo 1847. Atti delle adunanze dell'I.R. Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti. Dal Novembre 1846 all'ottobre 1847.

Navis, Adam R (2007) "Epidermal Growth Factor". *Embryo Project Encyclopedia*. ISSN: 1940-5030 <http://embryo.asu.edu/handle/10776/1719>.

Nickel M, Brümmer F (2003) In vitro sponge fragment culture of *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847). *J Biotechnol* 100:147-59

Nicklas M, Schatton W, Heinemann S, Hanke T, Kreuter J (2009a) Preparation and characterization marine sponge collagen nanoparticles and employment for the transdermal delivery of 17beta-estradiol-hemihydrate. *Drug Dev Ind Pharm* 35:1035-1042

Nicklas M, Schatton W, Heinemann S, Hanke T, Kreuter J (2009b) Enteric coating derived from marine sponge collagen. *Drug Dev Ind Pharm* 35:1384-1388

Okamoto K, Nakatsukasa M, Alie' A, Masuda Y, Agata K, Funayama N. 2012 The active stem cell specific expression of sponge Musashi homolog EflMsiA suggests its involvement in maintaining the stem cell state. *Mechanism of Development* 129:24-37

Pang K, Ryan JF, Baxeavanis AD, Martindale MQ (2011) Evolution of the TGF- β signaling pathway and its potential role in the Ctenophore, *Mnemiopsis leidyi*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024152>

Pfaf Michael W. fl in: Real-time PCR. Published by International University Line (Editor: T. Dorak), p 63-82 <https://www.gene-quantification.de/pfaffl-rel-quan-book-ch3.pdf>

Pisani D, Pett W, Dohrmann M, Feuda R, Rota-Stabelli O, Philipp H, Lartillot, Wörheide G (2015) Genomic data do not support comb jellies as the sister group to all other animals *PNAS* 112:15402-15407

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147

Pizette S, Niswander L (2000) BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol* 219:237-249

Pozzolini M, Scarfi S, Gallus L, Castellano M, Vicini S, Cortese K, Gagliani MC, Bertolino M, Costa G, Giovine M (2018) Production, characterization and biocompatibility evaluation of collagen membranes derived from marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847 *Marine Drugs* 29;16(4). pii: E111.

Pozzolini M, Scarfi S, Gallus L, Ferrando S, Cerrano C, Giovine M (2017) Silica-induced fibrosis: an ancient response from the early metazoans. *J Exp Biol* 220:4007-4015.

Pozzolini M, Scarfi S, Ghignone S, Mussino F, Vezzulli L, Cerrano C, Giovine M (2016a) Molecular characterization and expression analysis of the first Porifera tumor necrosis factor superfamily member and of its putative receptor in the marine sponge *Chondrosia reniformis*. *Dev Comp Immunol* 57:88-98

- Pozzolini M, Ferrando S, Gallus L, Gambardella C, Ghignone S, Giovine M (2016b) Aquaporin in *Chondrosia reniformis* Nardo 1847 and its possible role in interaction between cells and engulfed siliceous particles. *Biological Bulletin* 230:220-232
- Pozzolini M, Scarfi S, Mussino F, Ferrando S, Gallus L, Giovine M. (2015a) Molecular cloning, characterization and expression analysis of a prolyl 4-hydroxylase from the marine sponge *Chondrosia reniformis*. *Mar Biotechnol* (NY) 17:393-407
- Pozzolini M, Scarfi S, Mussino F, Salis A, Damonte G, Benatti U, Giovine M. (2015b) *Pichia pastoris* production of a prolyl 4-hydroxylase derived from *Chondrosia reniformis* sponge: A new biotechnological tool for the recombinant production of marine collagen. *J Biotechnol* 208:28-36
- Pozzolini M, Bruzzone F, Berilli V, Mussino F, Cerrano C, Benatti U, Giovine M (2012) Molecular characterization of a nonfibrillar collagen from the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo 1847 and positive effects of soluble silicates on its expression. *Mar Biotech* (NY) 14:281-93
- Ramoino P, Ledda FD, Ferrando S, Gallus L, Bianchini P, Diaspro A, Fato M, Tagliafierro G, Manconi R (2011) Metabotropic γ -aminobutyric acid (GABA(B)) receptors modulate feeding behavior in the calcisponge *Leucandra aspera*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 315:132-40
- Ramoino P, Gallus L, Paluzzi S, Raiteri L, Diaspro A, Fato M, Bonanno G, Tagliafierro G, Ferretti C, Manconi R (2007) The GABAergic-like system in the marine demosponge *Chondrilla nucula*. *Micros Res and Tech* 70: 944-951
- Ruggieri N., Castellano M., Misic C., Gasparini G., Cattaneo-Vietti R. and Povero P. (2006) Seasonal and interannual dynamics of a coastal ecosystem (Portofino, Ligurian Sea) in relation to meteorological constraints. *Geophysical Research Abstracts* 8, 07774.
- Sakou T (1998) Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 22: 591-603
- Scarfi S, Pozzolini M, Gallus L, Giovine M. (2018) Silica-induced fibrosis: from a physiological response in the early metazoans to the well-known pathological outcomes of higher vertebrates. *ISJ Inv. Survival J* 15:128-128
- Scarfi S. (2014) Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World J Stem Cells*; 6:153-162
- Shi W, Chang C, Nie S, Xie S, Wan M, Cao X (2007) Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J Cell Sci* 120: 1216-1224

Simpson TL (1984) The Cell Biology of Sponges Springer-Verlag, NewYork

Srivastava M, Simakov O, Chapman J (2010) The *Amphimedon queenslandica* genome and the evolution of animal complexity. Nature 466:720-726

Swatschek D, Schatton W, Kellermann J, Müller WE, Kreuter J (2002) Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. Eur J Pharm Biopharm 53:107-113

Tadokoro T, Gao X, Hong CC, Hotten D, Hogan BLM (2016) BMP signaling and cellular dynamics during regeneration of airway epithelium from basal progenitors. Development 143:764–773

Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. Microbiol Mol Biol Rev 71:295–347

Thomas TRA, Kaveklar DP, LokaBharathi PA. (2010) Marine drugs from sponge-microbe association-a review. Mar Drugs 8:1417-1468

Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfed JG, Tak PP (2008) Tumor necrosis factor antagonist mechanism of action: a comprehensive review. Pharmacol Ther 117:244-279

Vacelet J e Boury-Esnault N (1995) Carnivorous sponges. Nature 373:333–335

Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Börgermann JH, Graf D, Knaus P (2010) BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. Sci Signa 3(107):mr1. doi:10.1126/scisignal.3107mr1.

Weiskirchen R, Meurer SK (2013) BMP-7 counteracting TGFbeta1 activities in organ fibrosis. Front Biosci (Landmark Ed) 18:1407-1434

Wörheide G, Dohrmann M, Erpenbeck D, Larroux C, Maldonado M, Voigt O, Borchellinijj C, Lavrov DV (2012) Deep phylogeny and evolution of sponges (Phylum Porifera). Adv Mar Biol 61:1-78

Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ (2007) Bone morphogenetic protein. Biochem Biophys Res Commun 362:550-553

Zhang H, Du L, Zhong Y, Flanders KC, Roberts JD (2017) Transforming growth factor- β stimulates Smad1/5 signaling in pulmonary artery smooth muscle cells and fibroblasts of the newborn mouse through ALK1. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 313:L615-L627

7 RINGRAZIAMENTI

Molte persone mi hanno aiutato molto per lo svolgimento di questo lavoro.

Per primi voglio ringraziare chi mi ha presentato per il dottorato, la Prof^{ssa} Kristina Sepčič, la Prof^{ssa} Isabella Panfoli e il Prof. Carlo Cerrano.

Devo poi ringraziare la Prof^{ssa} Marina Pozzolini per il continuo ed eccellente aiuto molecolare e di pianificazione e la Prof^{ssa} Sara Ferrando per l'impagabile aiuto istologico in mezzi e suggerimenti.

Il lavoro non esisterebbe senza il Dott Marco Bertolino e il Dott Gabriele Costa, che hanno garantito l'approvvigionamento puntuale delle spugne e fornito preziose competenze zoologiche.

Le conoscenze e competenze bioinformatiche del Dott. Stefano Ghignone sono invece state come sempre preziose per l'analisi del trascrittoma.

Le osservazioni al SEM sono state rese possibili dalla perizia e disponibilità della Dott^{ssa} Laura Negretti e della Prof^{ssa} Laura Gaggero.

La Dott^{ssa} Maria Cristina Gagliani è stata generosa in consigli istologici e aiuto materiale e grazie a lei e alla Prof^{ssa} Katia Cortese è stato possibile effettuare le osservazioni al TEM.

Il Prof Giorgio Bavestrello è stato un punto di riferimento in materia di poriferi.

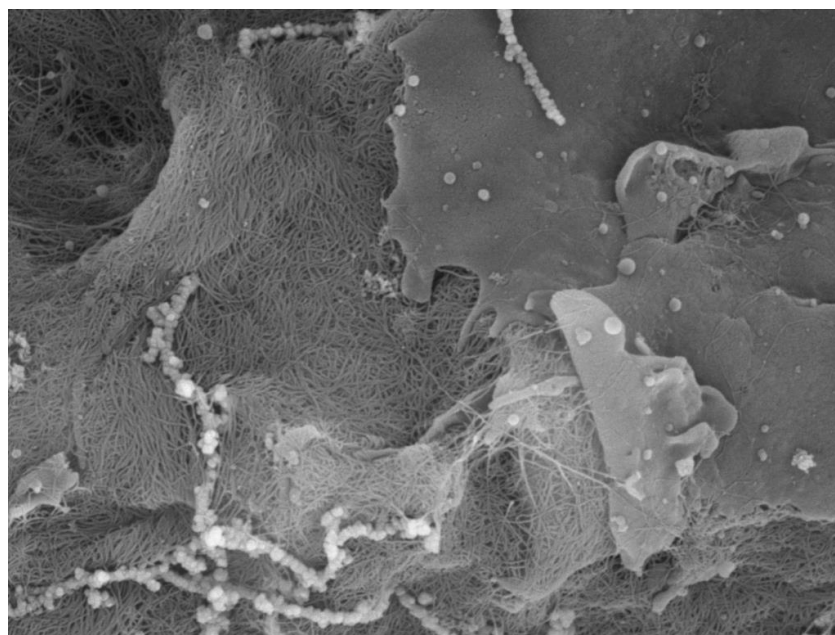
Ringrazio anche il Prof Marco Giovine per i consigli sulle questioni biotecnologiche riguardanti questo organismo da lui ben conosciuto.

Ringrazio la Prof^{ssa} Simona Candiani per l'ospitalità nel suo laboratorio e per l'aiuto ad affrontare l'ibridazione in situ in un organismo così peculiare, insieme al Dott Matteo Bozzo.

Per le analisi micologiche ad attrezzature e spugne devo ringraziare il gruppo della Prof^{ssa} Mirca Zotti, il Dott Giuseppe Greco e il Dott Simone Di Piazza.

Infine ringrazio per i consigli, la vicinanza in Università e l'aiuto, il Dott. Andrea Amaroli e il Dott. Marino Rottigni.

8 FIGURE



Particolare da Figura 2, esopinacociti e collagene.

Figura 1A	Albero filogenetico Bayesiano (inference strict consensus) dei TGF β	p 93
Figura 1B	Albero filogenetico Bayesiano (inference strict consensus) dei TGF β r	p 95
Figura 1C	Dominio con 7 cisteine caratteristico.	p 97
Figura 1D	Peptide segnale caratteristico.	p 99
Figura 2	Istologia generale.	p 101
Figura 3	Osservazioni al SEM.	p 103
Figura 4	Test Indian Ink.	P 105
Figure 5	Espressione dei TGF (1-6) e dei recettori TGFR (1, 2) identificati.	P 107
Figura 6	Profilo di espressione dei diversi TGF identificati.	P 109
Figura 7	Espressione di PIWI, Musashi e Bcl2, in <i>C. reniformis</i> in rigenerazione.	p 111
Figura 8	Espressione di collagene fibrillare, collagene non fibrillare, P4H (prolil 4 idrossilasi), e sintesi di tropocollagene, in <i>C. reniformis</i> in rigenerazione.	p113
Figure 9	Immunofluorescenze per Musashi in <i>C. reniformis</i> in rigenerazione.	p 115
Figura 10	ISH su Sezioni criostatiche <i>C. reniformis</i>	p 117
Figura 11	Comparazione microscopica della rigenerazione in fragmorph normali e trattati con inibitori LDN-212854 e SB-431542.	p 119
Figura 12	Espressione di collagene i presenza dell'inibitore LDN-212854.	p 121
Figura 13	schema riassuntivo finale.	P 123
Dati supplementari		
Accession Number		p 125/126
Figura BrdU		p 127

Figura 1A albero filogenetico Bayesiano (inference strict consensus) dei TGFβ.

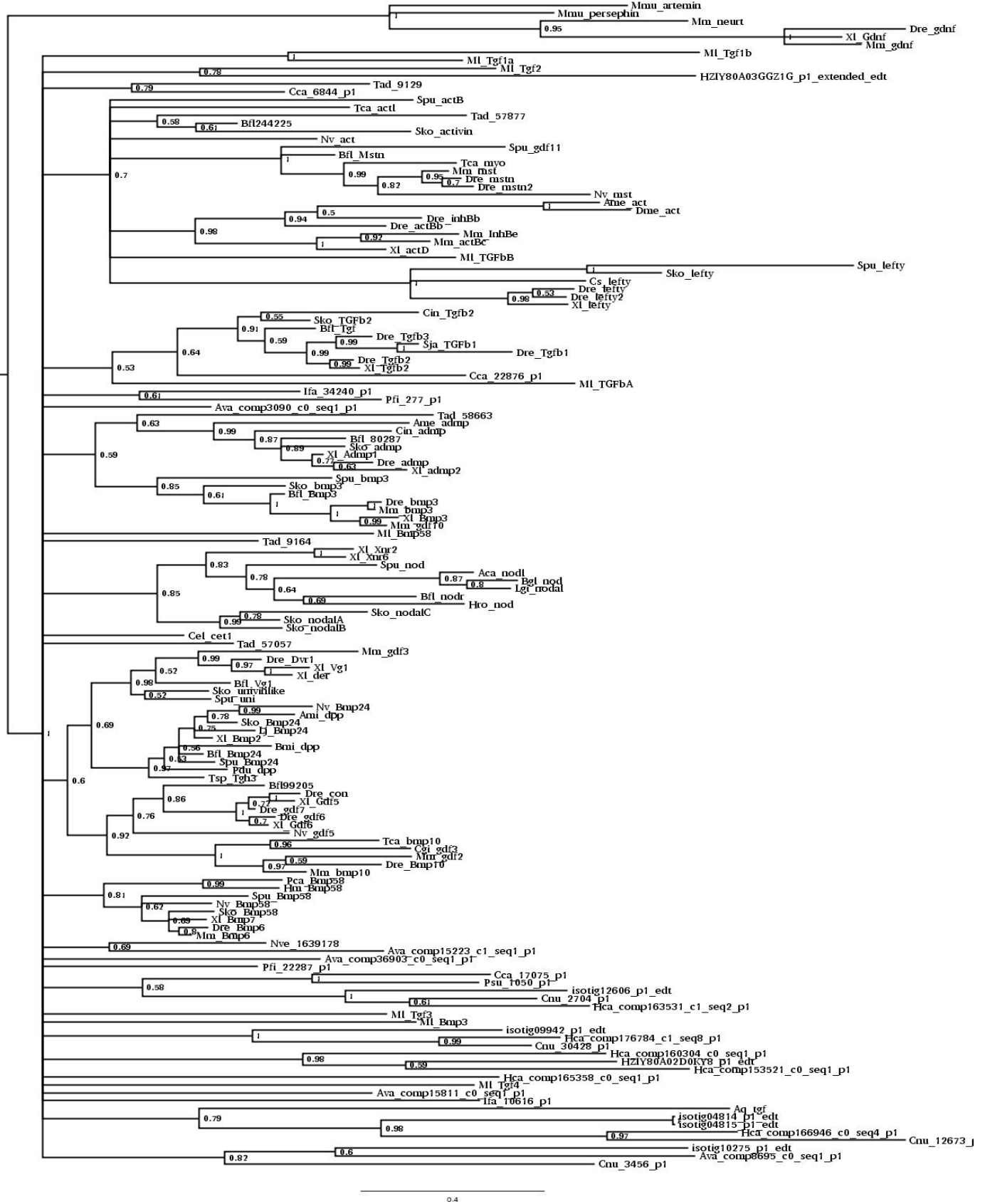


Figura 1A albero filogenetico Bayesiano (inference strict consensus) dei TGF β . La Figure 10A è derivata dall'allineamento dei domini dei peptidi TGF β utilizzati in Pang et al. (2011), che include taxa rappresentativi di deuterostomi, protostomi e non bilateri (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024152.s001>). I valori di supporto sono dati come probabilità bayesiana a posteriori. L'albero è ramificato al punto medio. La barra indica il numero di sostituzioni amminoacidiche per sito.

Principali specie di interesse utilizzate:

Nessun tag (solo isotig)	<i>C. reniformis</i>
Aq	<i>Amphimedon queenslandica</i>
Ava	<i>Aphrocallistes vastus</i>
Cnu	<i>Chondrilla nucula</i>
Cca	<i>Corticium candelabrum</i>
Hca	<i>Halisarca caerulea</i>
Ifa	<i>Ircinia fasciculata</i>
Pfi	<i>Petrosia ficiformis</i>
Psu	<i>Pseudospongosorites suberitoides</i>

Figura 1B Albero filogenetico Bayesiano (inference strict consensus) dei TGF β r

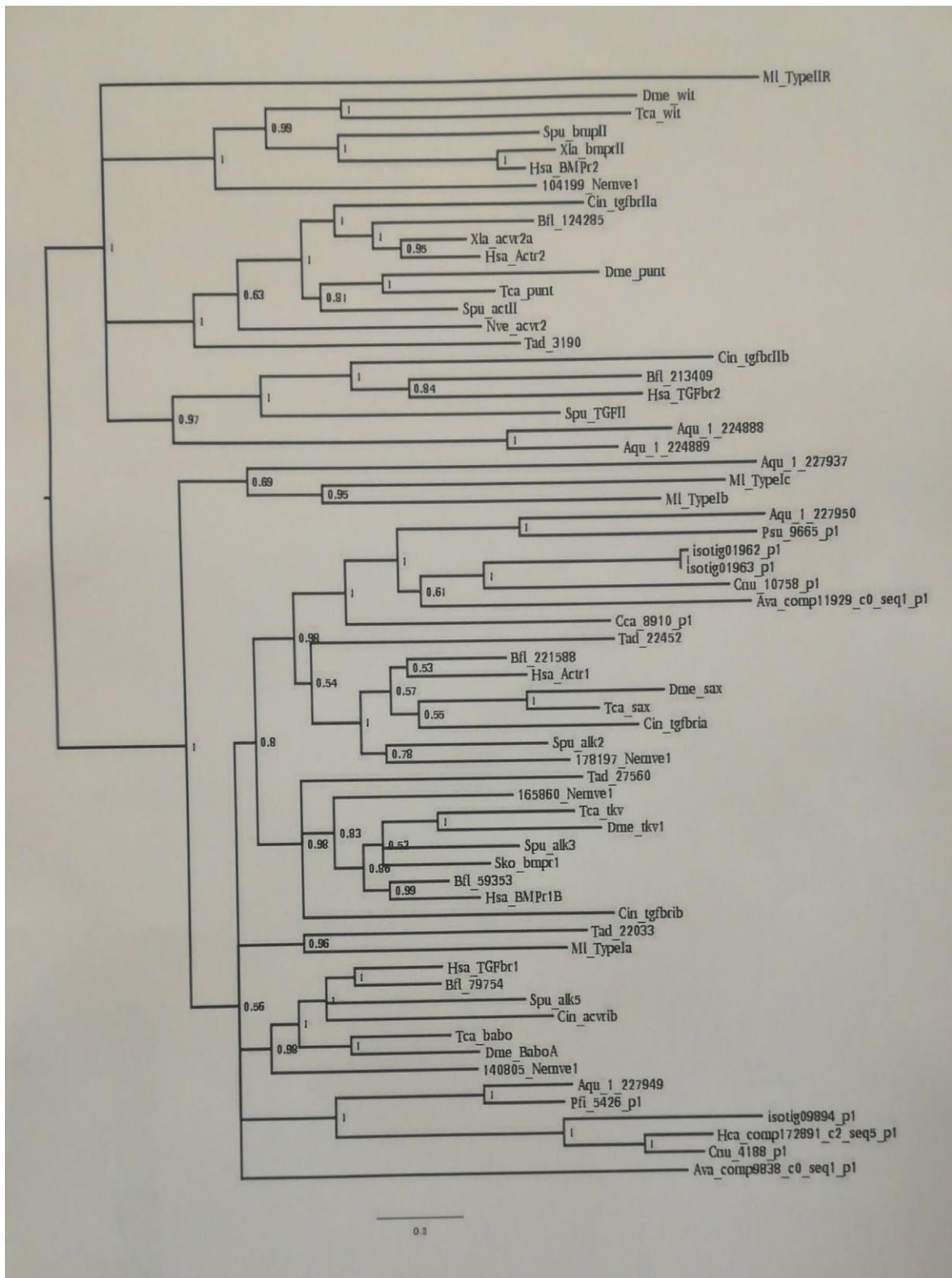


Figura 1B albero filogenetico Bayesiano (inference strict consensus) dei recettori TGF β R. The Figure 10A è derivata dall'allineamento dei domini dei peptidi TGF β utilizzati in Pang et al. (2011), che include taxa rappresentativi di deuterostomi, protostomi e non bilateri (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024152.s001>). I valori di supporto sono dati come probabilità bayesiana a posteriori. L'albero è ramificato al punto medio. La barra indica il numero di sostituzioni amminoacidiche per sito.

Figura 1C dominio con 7 cisteine caratteristico.

crTGF1	LLLHPGHVRSRQQRDTTDRIETTEATEATEATETTEEVPTATVEPSACSVKPLEIA----	313
crTGF2	LSELSSSDSKRERRSP-----LPF---MGGHCRRVSAWVRTE--	255
crTGF3	LSKEKEI---VKRSVIS-VPSE-----ISVSESSCRLVKRDV-YVAD	318
crtgf4	QI-----DTQSKRLTVDQIGNTRFC-----SN-LSTSCCLRNMTLDFHQD	50
crtgf5	GAE----DSGRHKRNQ-QEIEDYSCP-----ANN-TYRKCCRESLLIDLKKD	324
crTGF6	DEGESTISPNRPKRSTVKPVDNRNYDQ-----L-LRQRSLDPCAGYDFKV-TWED	136
hsaTGFb	QHL---QSSRHRRALDTNYC-----FSS-TEKNCCVRQLYIDFRKD	306
<hr/>		
crTGF1	YGWQLEENQIFGRSVDIGYCNGYCSDSFAASSLDVRTNMLKLARVLGYI----NPVDYPE	369
crTGF2	-LIQGSQIILLPTTINVGKCIIGSCSIETFVNKERIYG--TAHSSLLAVL-HKKDRRFTKP	311
crTGF3	IGLQDIK-F--PTRINLNYCAGSCNWPFPDEVNAPR-----SAWMQGRI-SHLSGEMPPP	369
crtgf4	LGFEFV---KKPRTINFGYCKGLCPLSYGRFLE-----TPQVYLYT--NKKNKTTITP	97
crtgf5	IGIGYE---IDPQTIDMGQCQGTCLFNSF-SG-----PSNSF-YY-HIARPTGIAS	370
crTGF6	LNWQDMA-VLPLGGFKTKYCTGTCPNPLNNNNNTL-----HAVIQALA-HRVYPDVPLP	188
hsaTGFb	LGWKWI---HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQ-----YSKVLALYNQHNPGASAAP	355
<hr/>		
crTGF1	KCVDPKTESLVVLYRTNGTKNNMKLQTIENLRVKSCKCAI	409
crTGF2	SCVPVSYKVTVAITYNAIKKR-QQTKLWTDLYVDKCGCR-	349
crTGF3	CCAPKDFDPVVISRKIGNI---MQT-KVEMIKVSSCECK-	404
crtgf4	CCTAGGYADLHLLLYEPID--GKYLYTLENTIALNCKCKN	135
crtgf5	CCVPDKFSPITLAIRKDER--T-ELVLFKTLKIKSCLCV-	406
crTGF6	CCAPKSLSPFAAVLIVDNV---VKVKRIPQLIVDKCACL-	224
hsaTGFb	CCVPQALEPLPIVYVGRK--P-KVEQLSNMIVRSCKCS-	391

Figura 1C dominio con 7 cisteine caratteristico.

Sequenze allineate al C-terminale utilizzando hsaTGFb (human). Le 7 cisteine del fondamentali (in giallo) al C-terminale infatti la famiglia delle TGF- β presenta il: (C...CXGXC...CC...CXCX). Nelle TGF1 e 2 la 4° cisteina risulta essere sostituite da lisina e serina rispettivamente. Nel riquadro (box rosso), è indicato il motivo di riconoscimento della proteina.

Figura 1D peptide segnale caratteristico.

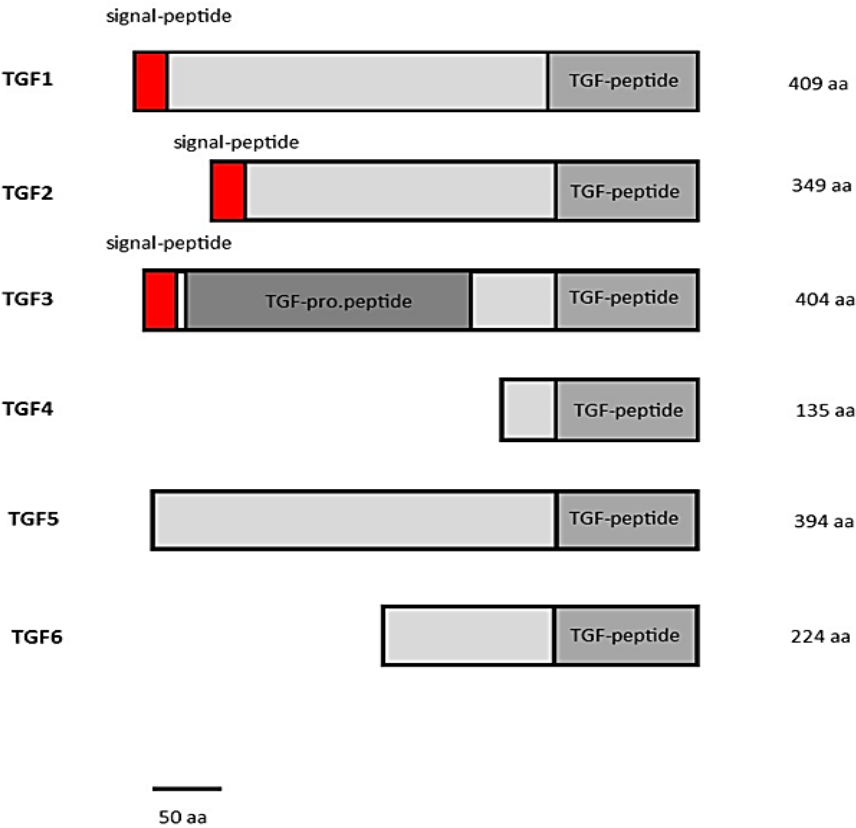


Figura 1D peptide segnale caratteristico.

Nella figura 9B nelle box dei sei TGF considerati, si vede che è stato messo in evidenza il peptide segnale caratteristico come solo per TGF1, 2 e 3.

Figura 2 Istologia generale. In questa tavola viene descritta la morfologia di *C. reniformis* wild type con l'utilizzo di diversi metodi microscopici.

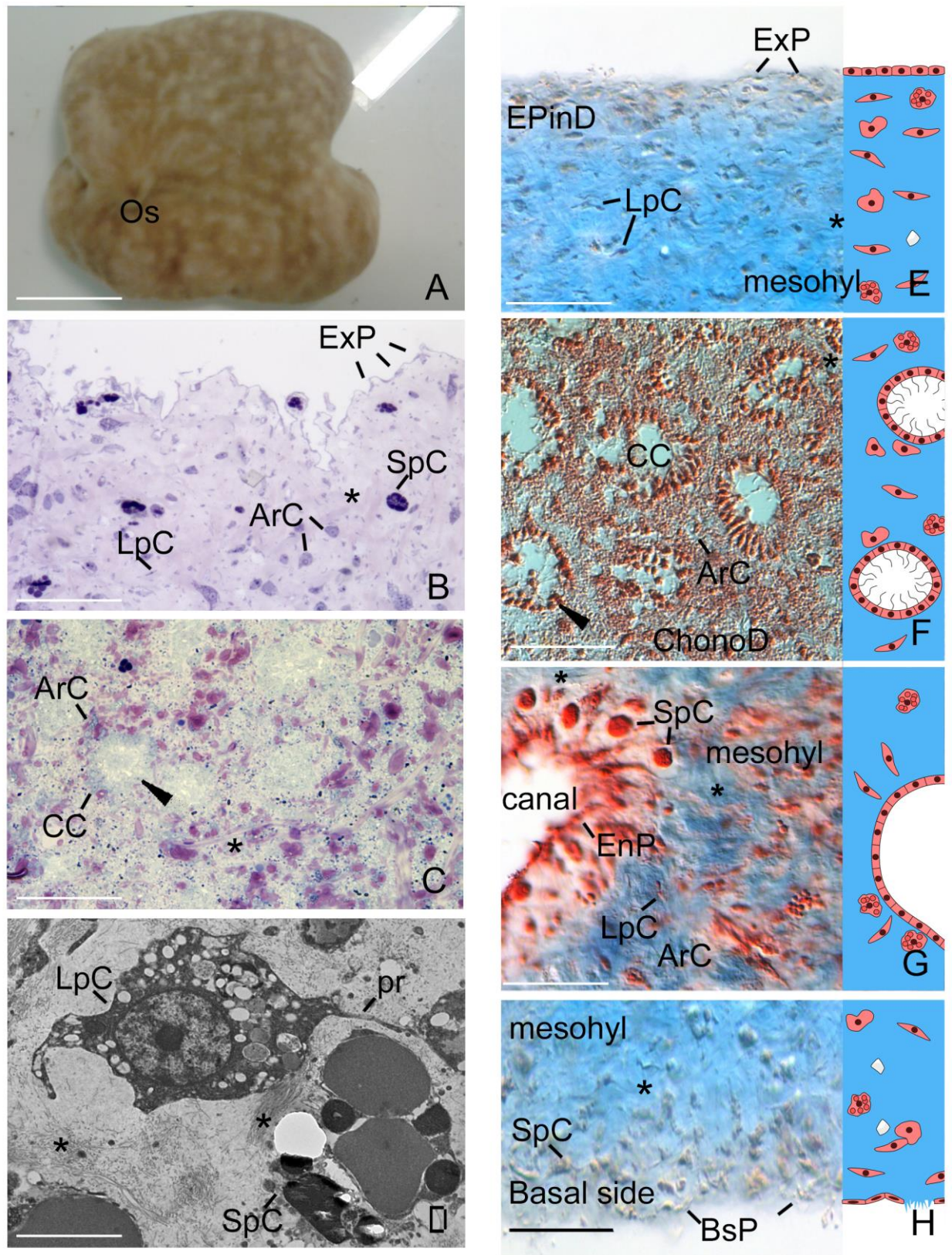


Figura 2 Istologia generale.

Figura 2 A) La spugna in acquario; bar 2 cm; B-C) sezioni semifini in resina; blu di toluidina. Bar 50 μm ; D) TEM, acetato d'uranile. Bar 3 μm ; E-H) Sezioni in paraffina, Tricromica di Masson. Banda laterale a destra con *cartoon* esplicativo, E, F, H: Bar 50 μm , G: Bar 80 μm ; **Os**: osculo; **ExP**: esopinacociti; **LpC**: lofociti; **SpC**: cellule sferulose; **ArC**: archeociti; **asterisco singolo**: matrice di collagene; **CC**: camere coanocitarie; **teste di freccia**: coanociti; **pr**: prolungamenti lofociti; **EPinD**: strato più esterno, pinacoderma; **mesohyl**: strato intermedio ricco in collagene, mesoilo; **Choanoderm**: strato ricco in camere coanocitarie, più interno, coanoderma; **canal**: canale interno della spugna; **strato basale**: corrisponde alla porzione dell'animale a contatto con il substrato, o ricca in collagene come il mesoilo o che, oltre al collagene, presenta uno strato cellulare anche non continuo costituito da esopinacociti, basopinacociti o basociti.

Figura 3 Osservazioni al SEM

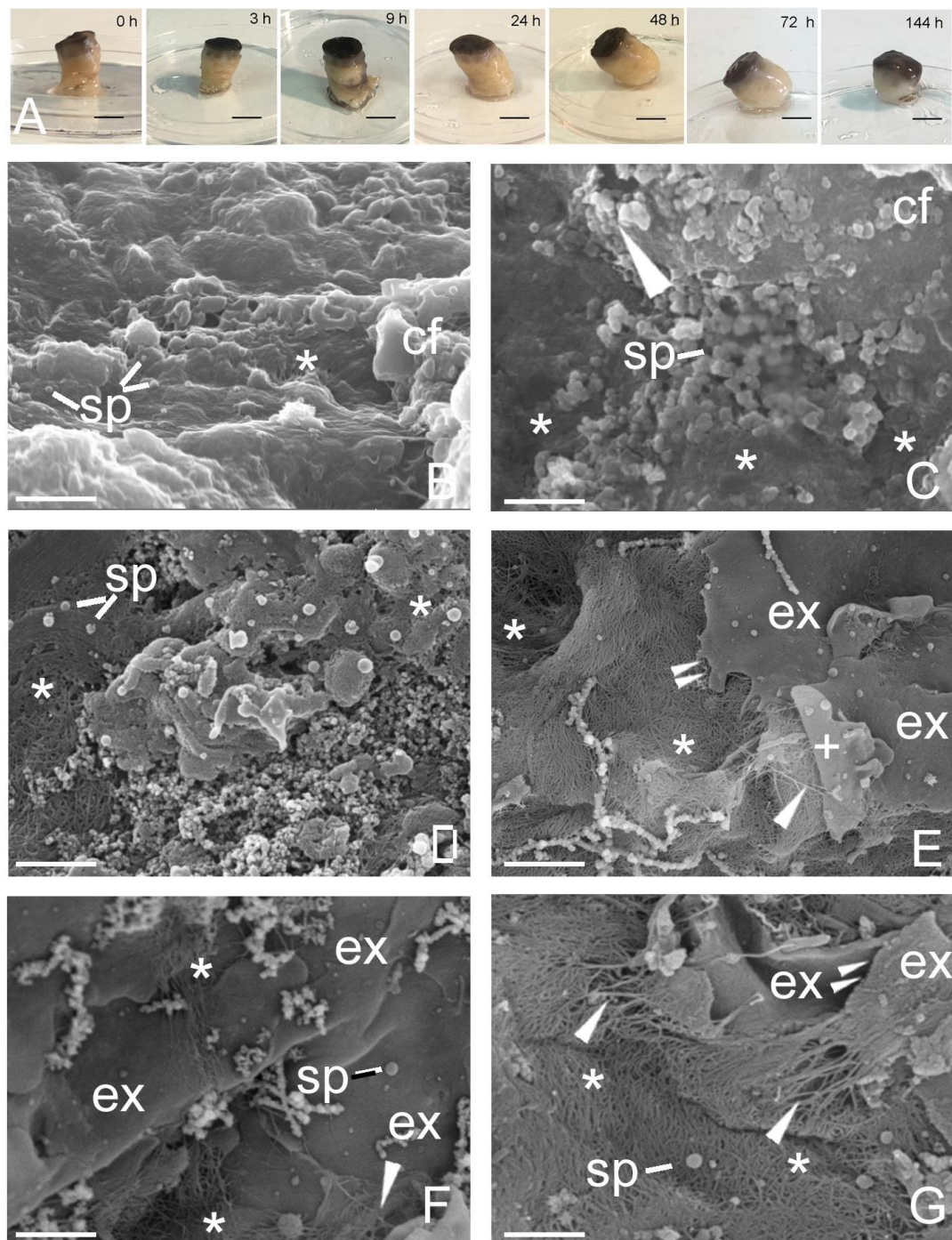


Figura 3 Diverse immagini della superficie dei fragmorph esposta dal taglio del carotaggio osservare tramite SEM. In A) fragmorph dopo tempi crescenti dal taglio fotografati per mostrare le modificazioni morfologiche macroscopiche. A-E: Bar 2 μm ; G: Bar 3 μm tempo in ore: B 0; C 24; D 48; E 72; F 144; G 144, particolare di F.

asterisco singolo: matrice di collagene; cf: cell fragment (frammento di cellula) ex: esopinacociti; sp: sferule; testa di freccia: fibre di collagene bene evidenti; doppia doppia testa di freccia: bordo della membrana cellulare

Figura 4 Test Indian Ink

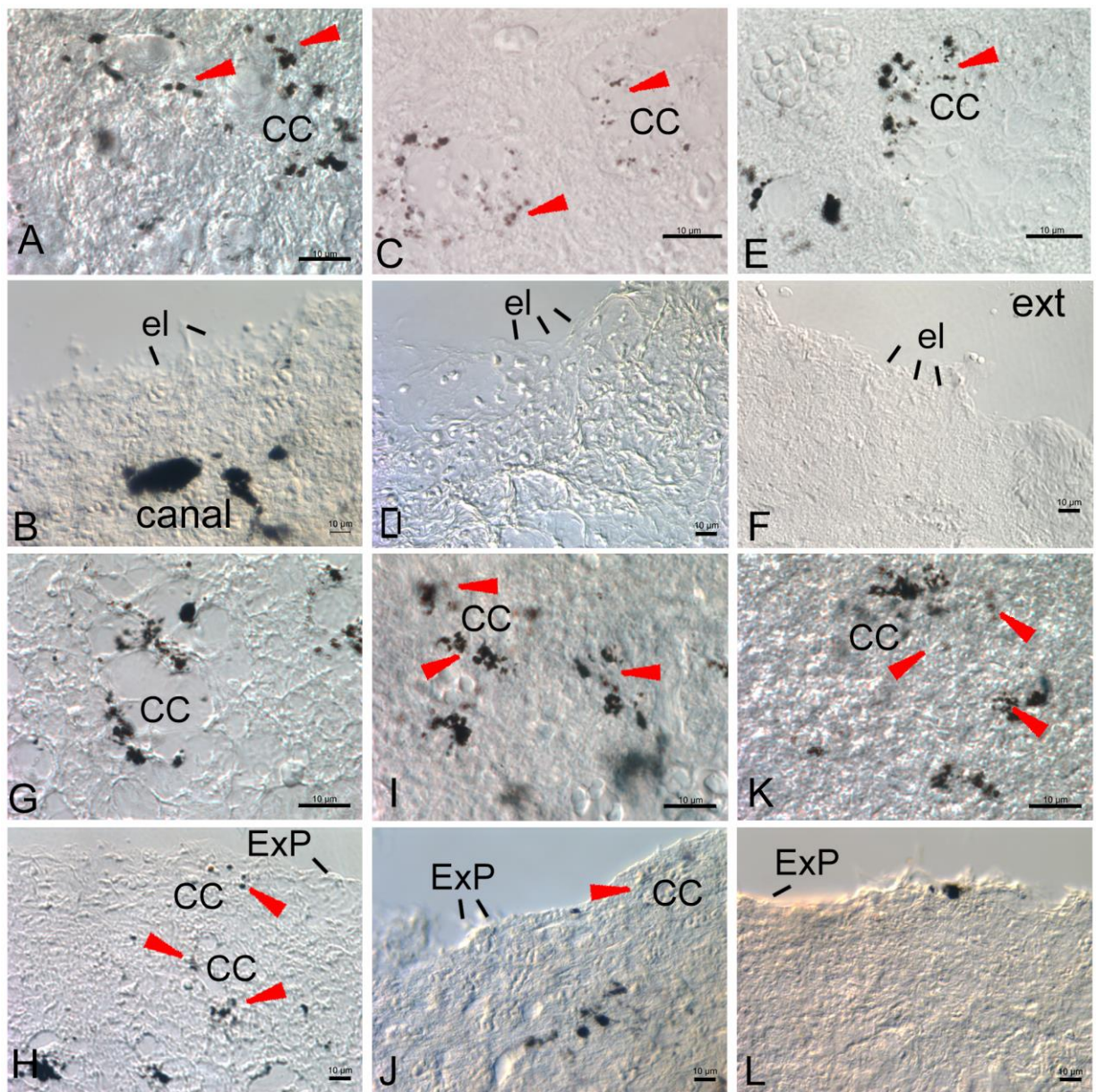


Figura 4 Test Indian Ink.

In questa tavola viene descritta la morfologia di *C. reniformis* durante la rigenerazione dopo trattamento o.n. con 2% di Indian Ink in acqua di mare, osservata in DIC dopo fissazione e taglio in paraffina senza ulteriori trattamenti.

A, C, E, G, I, K: coanosoma;

B, D, F, H, J, L: porzione lato taglio.

A, B: 0h; C, D: 24h; E, F: 48h; G, H: 72h; I, J: 120h; K, L: 144h.

el: strato esterno; CC: camere coanocitarie; testa di freccia rossa: coanocita:

Barre 100 µm

Figure 5 Espressione dei TGF (1-6) e dei recettori TGFR (1, 2) identificati.

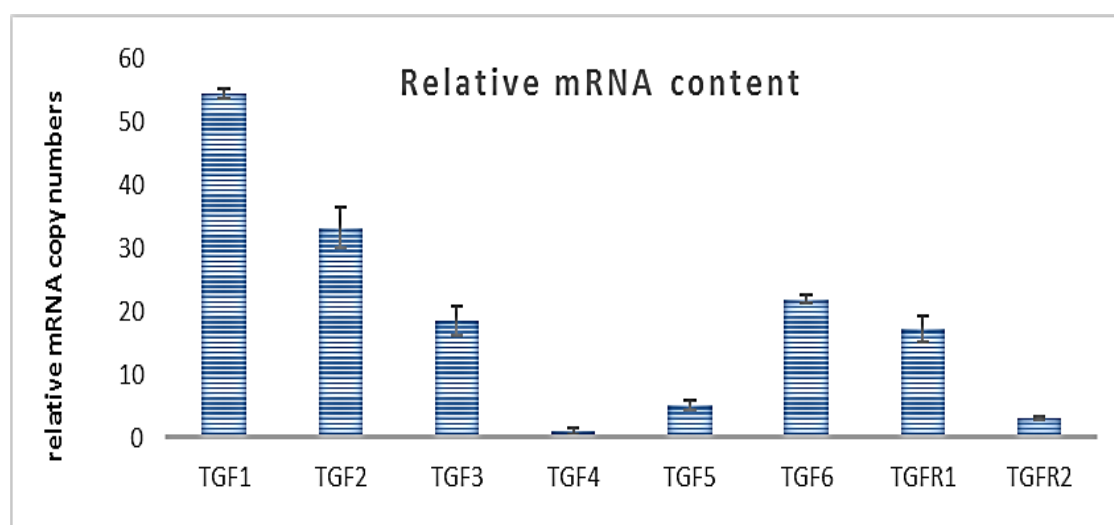


Figura 5 Espressione dei TGF (1-6) e dei recettori TGFR (1, 2) identificati.

Qui si può osservare l'espressione dei geni TGF (1-6) considerati e TGFR1 e 2. I risultati sono normalizzati considerando minore l'espressione di TGF4, (ciclo soglia più alto). I TGF4 e 5 sono i meno espressi rispetto. Nei due TGFR l'1 è espresso con un rapporto di 5 ad 1, considerando in condizioni normali.

Figura 6 profilo di espressione dei diversi TGF identificati.

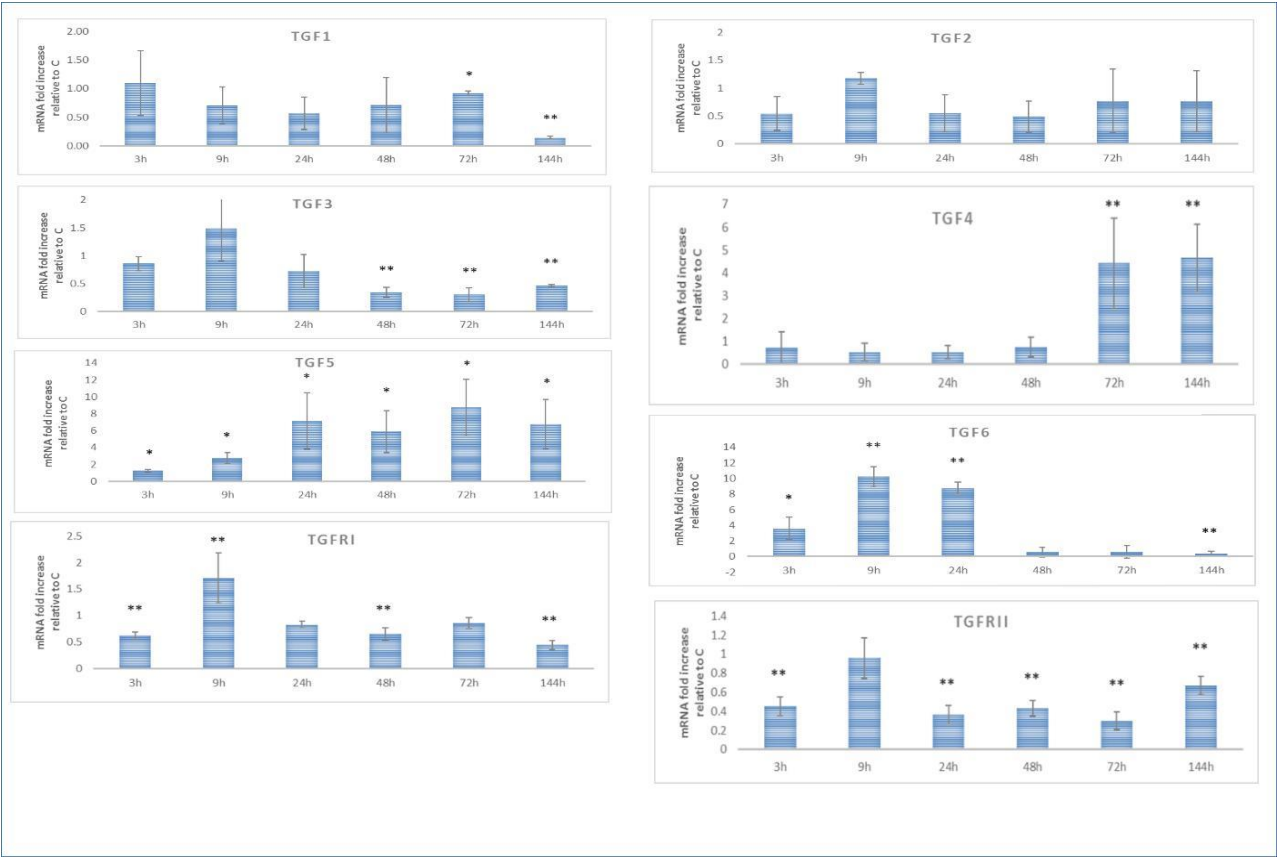


Figura 6 Qui profilo di espressione dei TGF osservati durante la rigenerazione.

L'espressione di TGF1 e 3 rimane stabile fino alle 72 e 48 ore rispettivamente. TGF4 e 5 mostrano, un diverso profilo di variazione ma comunque una variazione nel tempo significativa: TGF4 rimane costante fino alle 72 e 144 ore, quando aumenta, con la maggiore variazione relativa fra tutte. Il TGF5 precocemente e per tutto il tempo aumenta il livello di espressione. Il TGF2 non ha varia significativamente e il TGF6 aumenta fino al t 24 ore, diminuisce poi in modo significativo a 144 ore. I due recettori TGFR, 1 e 2, manifestano un aumento di espressione per tutto il tempo degli esperimenti fino alle 144 ore.

Figura 7 Espressione di PIWI, Musashi e Bcl2, in *C. reniformis* in rigenerazione.

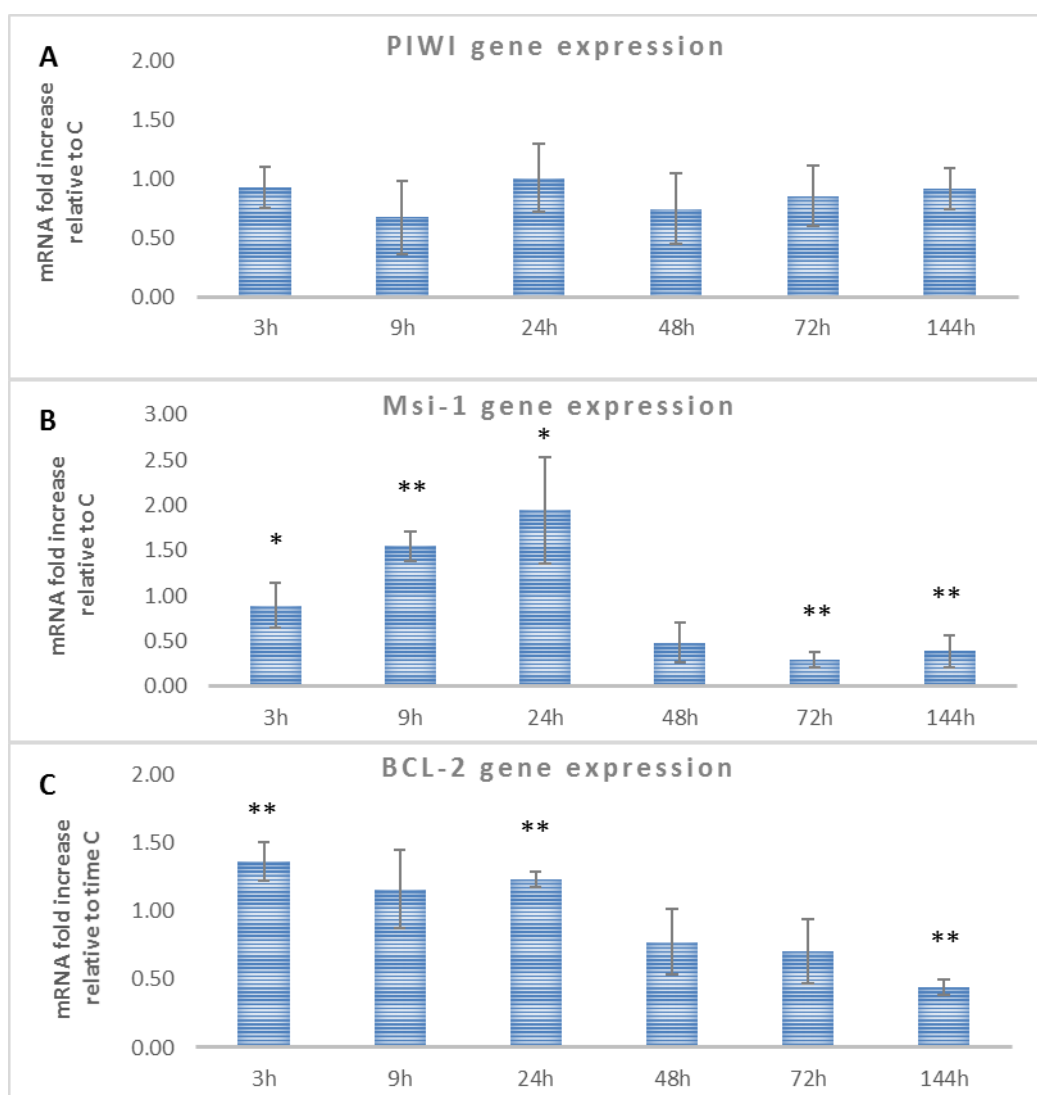


Figura 7

L'espressione di PIWI rimane costante nelle 144 ore, quella di Msi raddoppia al tempo 24 ore e cade sotto i livelli del tempo 0 fino al tempo di osservazione più lungo considerato, le 144 ore. L'espressione di Bcl-2 mostra una diminuzione che la dimezza alle 144 ore.

Figura 8 Espressione di collagene fibrillare, collagene non fibrillare, P4H (prolil 4 idrossilasi), e sintesi di tropocollagene, in *C. reniformis* in rigenerazione.

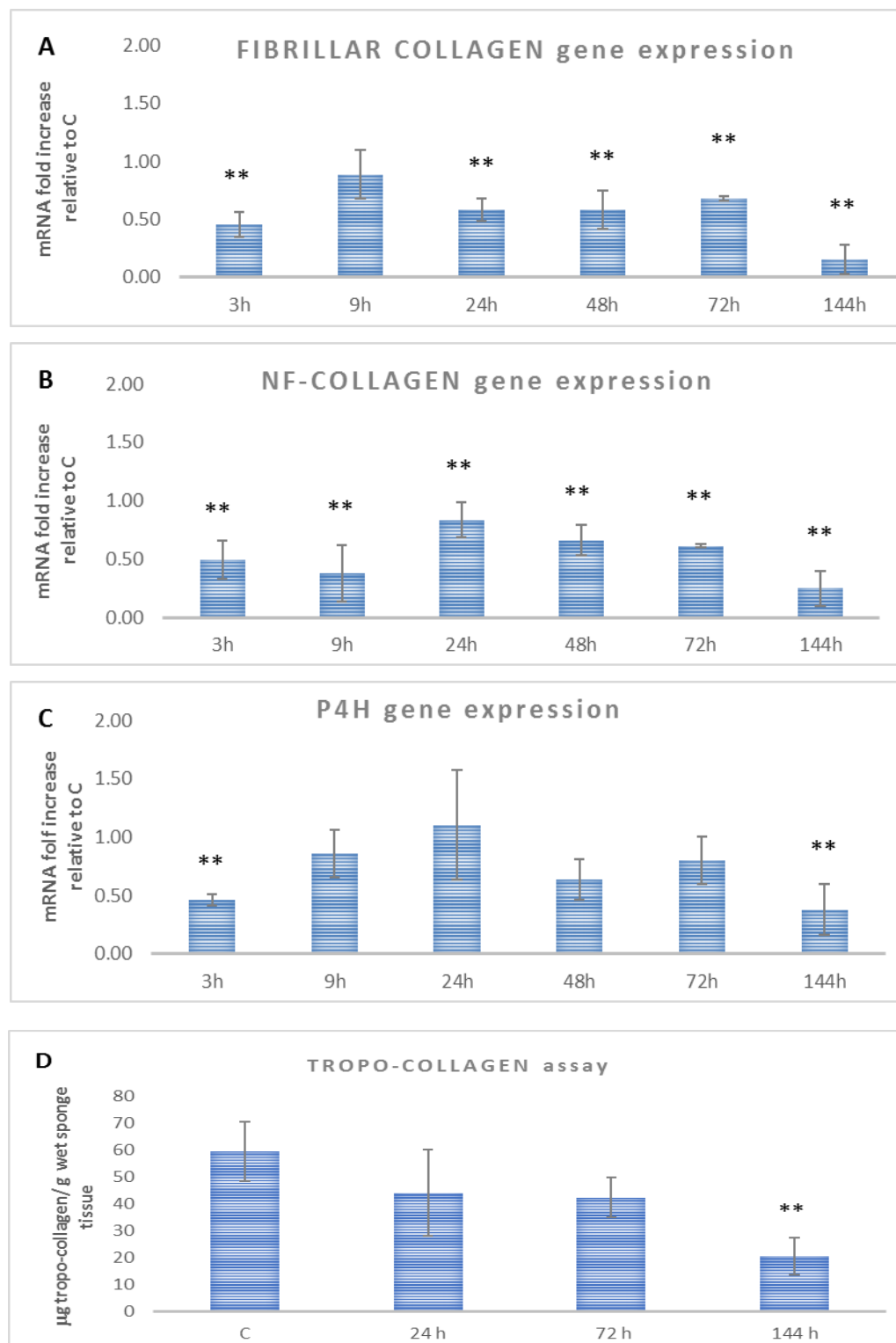


Figura 8 Espressione di collagene fibrillare, collagene non fibrillare, P4H (prolil 4 idrossilasi), e sintesi di tropocollagene, in *C. reniformis* in rigenerazione.

Diminuisce in modo statisticamente significativo l'espressione dei collagene e anche l'espressione per l'enzima P4H, non varia se non per una diminuzione alle 3 ore e alle 144 ore di osservazione. La diminuzione di sintesi del collagene è confermata dal saggio SIRCOL.

Figure 9 Immunofluorescenze per Musashi in *C. reniformis* in rigenerazione.

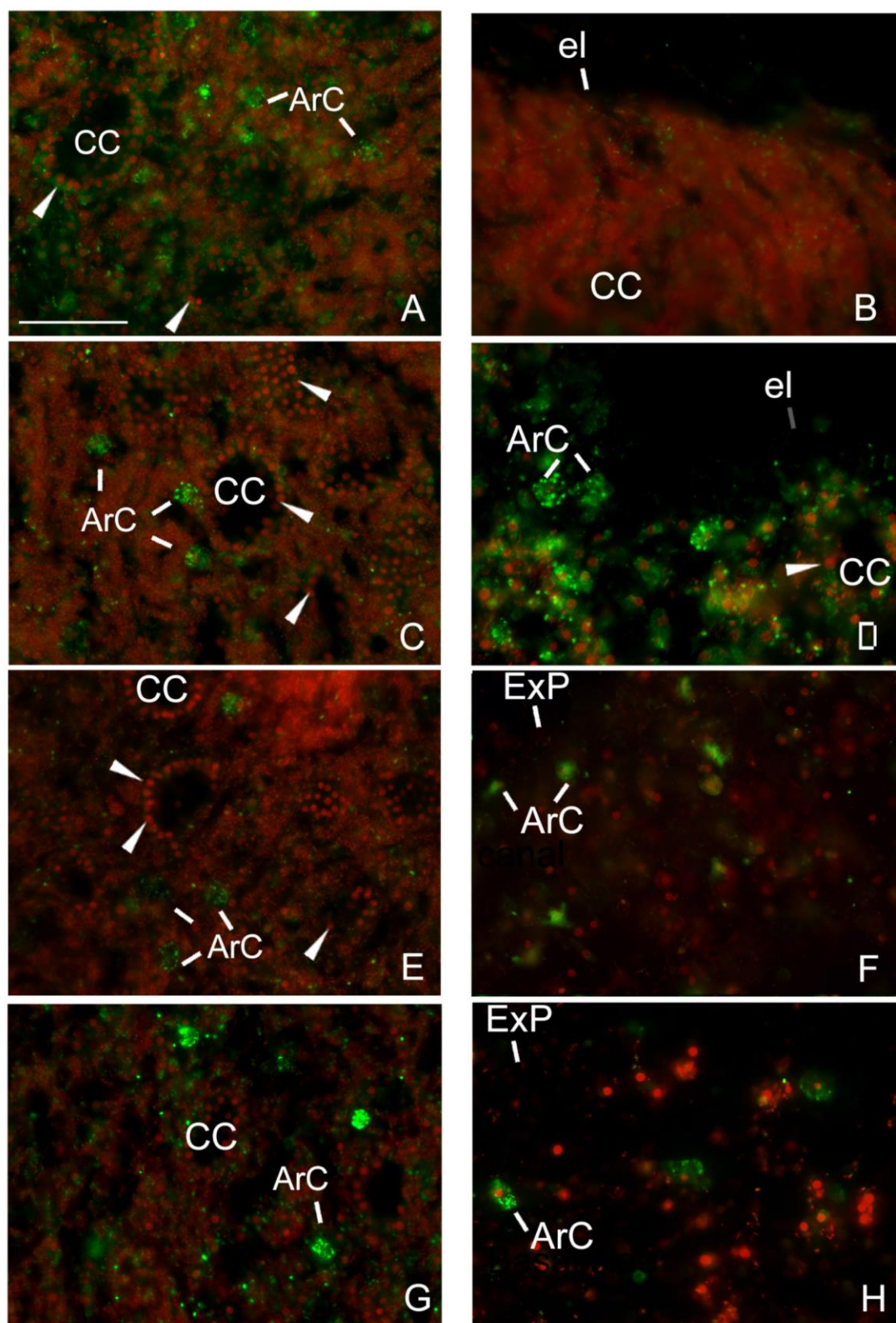


Figura 9 Immunofluorescenze per Musashi.

Sono risultate chiaramente positive solamente le cellule appartenenti ad un unico tipo cellulare, uniforme come forma, dimensione e posizione. Da 72 ore e fino alle 144 aumenta la presenza di archeociti positivi per Musashi nella zona di taglio e non varia la presenza di archeociti nel coanoderma.

Exp: esopinacociti; SpC: cellule sferulose; ArC: archeociti; CC: camere coanocitarie; teste di freccia: coanociti; el: strato più esterno.

Figura 10

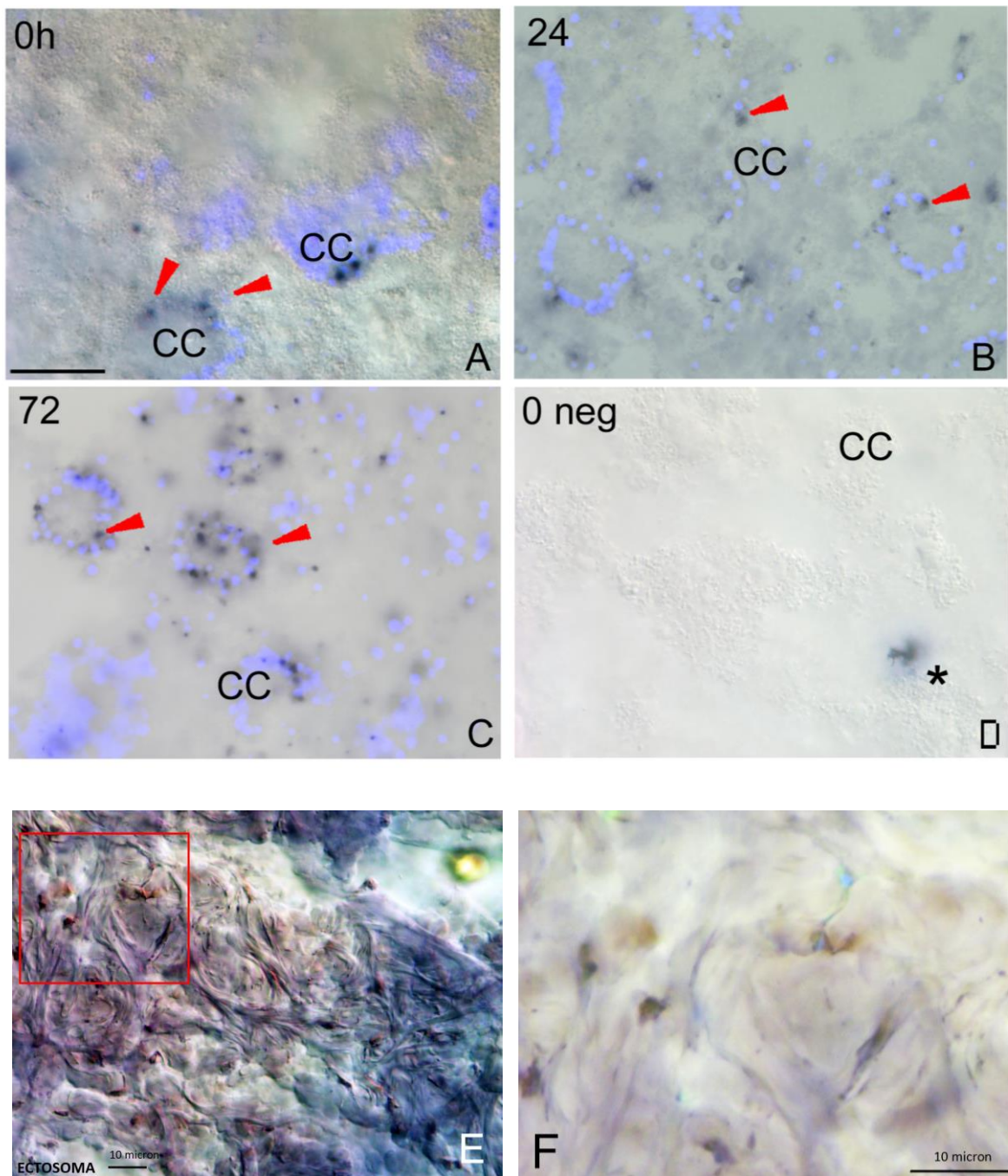


Figura 10 ISH su Sezioni criostatiche *C. reniformis*

A-C Segnale della ribosonda antisenso di mRNA per TGF6. D Sezioni ibridate con la ribosonda senso per TGF6.

E-F Distribuzione del segnale della ribosonda antisenso di mRNA di COLCh in cui è possibile osservare la distribuzione del segnale nei lofociti facilmente identificabili per la forma fusiforme, le dimensioni e l'affinità per la lectina WGA, che appaiono immersi nella matrice di collagene nel mesoilo. **Asterisco**: precipitato aspecifico; w: positività per WGA, in parte coperta dal segnale per JSH. Barra A-D: 200 µm; C-D 10 µm.

Figura 11 Comparazione microscopica della rigenerazione in fragmorph normali e trattati con inibitori LDN-212854 e SB-431542.

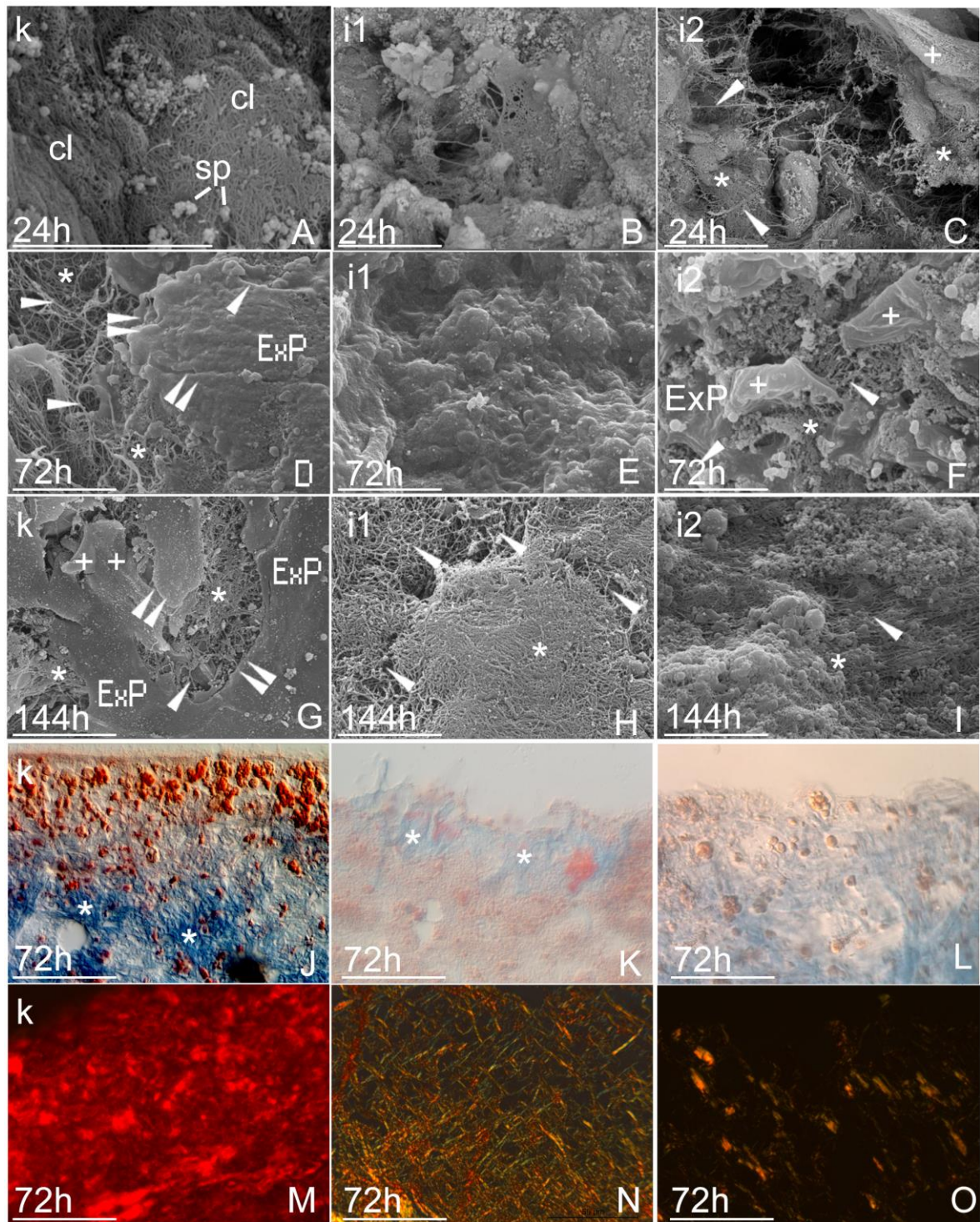


Figura 11 Comparazione microscopica della rigenerazione in fragmorph normali e trattati con inibitori LDN-212854 e SB-431542.

Sono esposti i risultati comparati delle osservazioni al SEM durante la rigenerazione in uno dei controlli e in due dei trattati, affiancate ad osservazioni istologiche classiche in luce con Sirius Red e Tricromica di Masson.

cl: collagene esposto; +: frammento di cellula; doppia testa di freccia: bordo cellule; singola testa di freccia: fibre collagene di grande calibro; ExP: esopinacociti; Sp: sferule.

Figura 12 espressione di collagene i presenza dell’inibitore LDN-212854

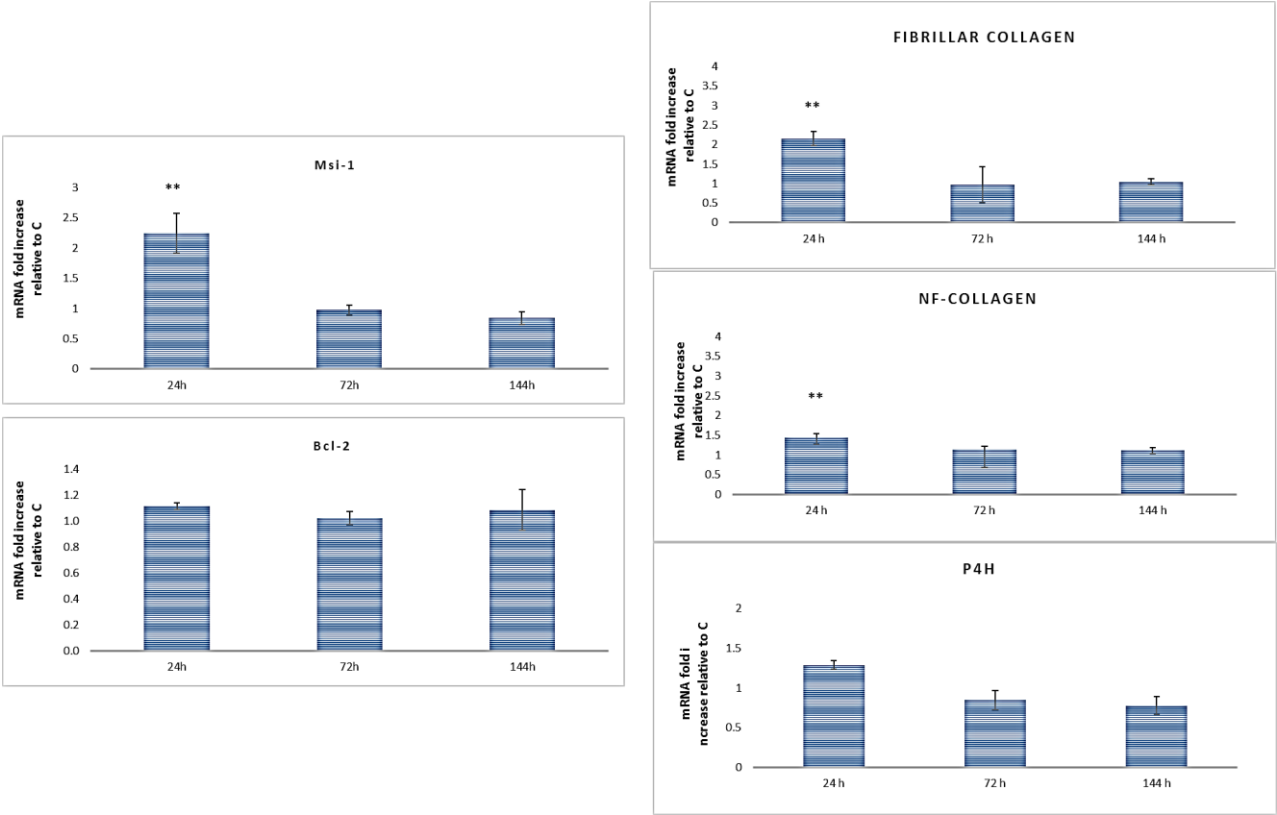


Figura 12 Espressione in fragmorph in rigenerazione, esposti a LND-212854, di collagene fibrillare e non fibrillare di *C. reniformis*, P4H, Musashi e Bcl2.

Figura 13 schema riassuntivo finale

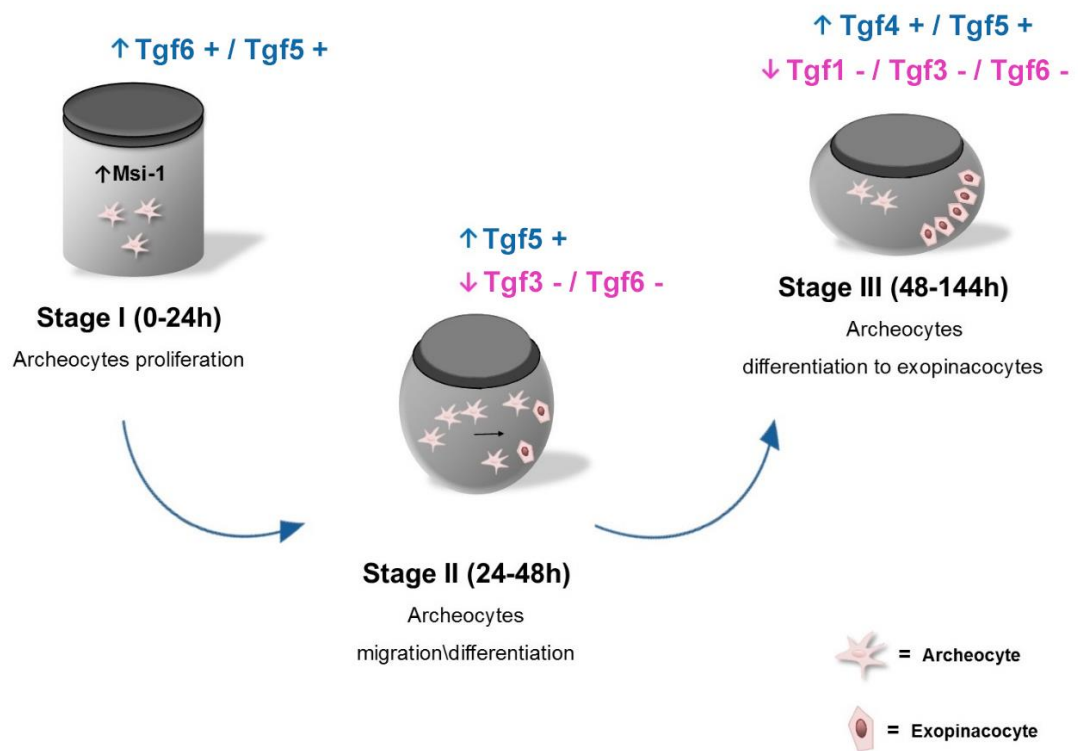


Figura 13

In conclusione proponiamo una *stadiazione del processo di recupero cellulare* in forza dei dati molecolari e morfologici esposti. Tutto il processo di rigenerazione si articolerebbe in questi tre stadi.

Dati supplementari

<i>Name</i>	<i>Sequence (5'-3')</i>	<i>Position</i>	<i>Accession number</i>
FTgf1 (forward)	<i>TGACCGTATAGAACTACAGAAG</i>	870-892	MH687917
RTgf1 (reverse)	<i>TGAACAATAGCCATTACAATAACC</i>	1039-1062	MH687917
FTgf2 (forward)	<i>TCTGGCGATGCGGTGGTG</i>	304-321	MH687918
RTgf2 (reverse)	<i>AAGCGTTTGGGAGACTGTTAGG</i>	435-456	MH687918
FTgf3 (forward)	<i>TGCCAATACCGTCCAAGTC</i>	320-338	MH687919
RTgf3 (reverse)	<i>TGCCTTCTCCTCCTCTG</i>	493-510	MH687919
FTgf4 (forward)	<i>CATGAATGAAGCAATATCAACTG</i>	6-28	MH687920
RTgf4 (reverse)	<i>ATTATTGTTTCGTGGTTTCTTAC</i>	166-189	MH687920
FTgf5 (forward)	<i>CCTACTGGCATTGCTTCCTG</i>	134-153	MH687921
RTgf5 (reverse)	<i>AGTCCTTTCGTCTTTCCTTATCG</i>	189-211	MH687921
FTgf6 (forward)	<i>CCACCTCTGAACAACAACAATAAC</i>	483-506	MH687922
RTgf6 (reverse)	<i>CTATGAGCACGGCAGCAAAG</i> <i>GAGGTTTCATCGGAGCAGAC</i>	593-612	MH687922
FTgfR1 (forward)	<i>GAGGTTTCATCGGAGCAGAC</i>	587-605	MH687923
RTgfR1 (reverse)	<i>TGTTGAGGAAGGTGGATATGG</i>	700-720	MH687923
FTgfR2 (forward)	<i>GCCATACTCTCCTACATTAC</i>	306-325	MH687924
RTgfR2 (reverse)	<i>GGTTATCACTTCTCCTCTG</i>	487-505	MH687924
FPiwi (forward)	<i>TGGCTTCAGTAGGCAACC</i>	572-589	MH687925
RPiwi (reverse)	<i>CACCAGGAAGAAGTCATAACC</i>	664-684	MH687925
FMusashi (forward)	<i>ATTGGAATGCTTAGTGAAATGC</i>	428-449	MH687926
RMusashi (reverse)	<i>GTGTCTACCTTGCCTATTGC</i>	598-617	MH687926

Figura BrdU

